

**ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES
NA IDADE PEDIÁTRICA**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DAS SUAS PRINCIPAIS
COMPLICAÇÕES E INDICADORES DE PROGNÓSTICO**

LÍGIA MARIA LACERDA BARBOSA BRAGA

2004

**Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em
Medicina/Pediatria pela Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Nova de Lisboa**

**ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES
NA IDADE PEDIÁTRICA**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DAS SUAS PRINCIPAIS
COMPLICAÇÕES E INDICADORES DE PROGNÓSTICO**

Orientador:

Professor Doutor João Manuel Videira Amaral

Co-orientadora:

Professora Doutora Maria Julieta Esperança Pina

LÍGIA MARIA LACERDA BARBOSA BRAGA

LISBOA 2004

Nesta dissertação usaram-se resultados parcialmente apresentados em reuniões científicas ou publicados.

1. Braga LB e Candeias F. Anemia de células falciformes. Repercussão no neurodesenvolvimento. 4º Congresso Científico dos Hospitais Cíveis de Lisboa. Lisboa, Novembro de 1999.
2. Braga LB, Correia I, Miranda A, Picanço I, Seixas MT, Ferreira I, Santos T, Santos HA, Rosário T, Nogueira F, Griffe I, Viveiros A, Nogueira P. Factores de risco para os episódios vaso-oclusivos em crianças com anemia de células falciformes. Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia. Évora, Novembro de 2002.
3. Calado E, Braga LB, Candeias F, Caeiro L, Duarte J, Ribeiro J. Doença cerebrovascular na anemia de células falciformes. Congresso Português de Neurologia. Lisboa, Novembro de 2001.
4. Braga LB, Nogueira G, Ferreira M, Kaku Sashicanta, Amaral JMV. Alterações cardiovasculares em crianças com anemia de células falciformes. XXIV Congresso Português de Cardiologia. Funchal, Abril de 2003.
5. Braga LB, Calado E, Ribeiro J, Caeiro L, Duarte J. Comparison of magnetic resonance imaging, neuropsychologic impairment and transcranial doppler ultrasonography in children and adolescents with sickle cell anemia. 8th Annual Congress of the European Hematology Association. Lyon, Junho de 2003.
6. Braga LB, Miranda A, Picanço I, Seixas MT, Ferreira I, Santos T, Santos HA, Rosário T, Nogueira F, Griffe I, Viveiros A, Nogueira P. Risk factors for vaso-occlusive episodes in children with sickle cell anemia. 8th Annual Congress of the European Hematology Association. Lyon, Junho de 2003.
7. Braga LB, Ferreira AC, Guimarães M, Nazário C, Pacheco P, Miranda A, Picanço I, Seixas T, Rosado L, Amaral JMV. Clinical and laboratory effects of hydroxyurea in children and adolescents with sickle cell anemia. A portuguese hospital study. *Hematology J* 2005; 29 (3). *In press*.

Mas as crianças, Senhor,
Porque lhes dais tanta dor?!
Porque padecem assim?!

Augusto Gil
Balada da neve

Aos meus Pais

Ao Carlos e aos nossos filhos

Miguel, Pedro e João

A execução técnica desta dissertação teve lugar nas seguintes instituições

- 1 - Unidade de Hematologia do Serviço 1 do Hospital de Dona Estefânia (Director: Professor Doutor João M. Videira Amaral)
- 2 - Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Dona Estefânia (Director: Dr. M Edmar Oliveira)
- 3 - Serviço de Imagiologia do Hospital de Dona Estefânia (Director: Dr. Francisco Abecassis)
- 4 - Laboratório de Provas Funcionais Respiratórias no Serviço de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia (Director Dr. José Rosado Pinto)
- 5 - Ressonância Magnética - Caselas (Directora Dr.^a Constança Jordão)
- 6 - Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Genética Humana e no Laboratório de Hematologia do Centro de Biopatologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge de Lisboa (Director: Dr. João Lavinha)
- 7 - Serviço de Medicina 2 do Hospital S. José (Director: Dr. Arlindo Baptista)
- 8 - Serviço de Cardiologia Pediátrica do Hospital de Santa Marta (Director: Professor Doutor Sashikanta Kaku)

AGRADECIMENTOS

Às crianças que contribuíram para este projecto de investigação e aos seus pais que, com boa vontade e discernimento, consentiram a sua participação. Agradeço e espero, com este estudo, ter conseguido honrar a sua generosidade.

Estou eternamente grata à Professora Doutora Maria Gertrudes Gomes da Costa, que me proporcionou o prazer de descobrir a Hematologia Pediátrica, pelo incentivo que me deu para prosseguir no sentido de uma carreira docente e a quem devo o convite para me apresentar a provas de doutoramento. Verdadeiro pilar desta investigação, todo o meu reconhecimento e a minha maior gratidão pela confiança em mim depositada, pelo constante estímulo e por me ter prestigiado desde há muitos anos com a sua amizade.

Ao Professor Doutor Nuno Cordeiro Ferreira a expressão mais sincera do meu reconhecimento pelo caloroso acolhimento, apoio humano e ensinamentos de inestimável valor na minha formação pediátrica, a quem devo a reintrodução e prossecução na carreira universitária.

Agradeço ao Professor Doutor João Manuel Videira Amaral orientador desta tese por o ter feito sempre de uma forma dedicada, atenta e amiga, com os seus preciosos conselhos, sugestões e talento didáctico, e por me ter transmitido o seu sentido de investigação científica e o rigor da escrita.

À Professora Doutora Maria Julieta Esperança Pina, manifesto a minha franca gratidão, pela honra que me concedeu ao ter aceite a tarefa de ser co-orientadora desta dissertação, para a qual validamente contribuiu com pertinentes críticas e sugestões e de quem sempre senti apoio e a ajuda imprescindível no orientar e concretizar dos meus objectivos.

Ao Professor Doutor Nuno Neuparth pela total disponibilidade e auxílio no estudo da avaliação funcional respiratória, agradeço a clareza de juízo, entusiasmo e optimismo, fundamentais no contornar das minhas dúvidas e hesitações. Foi extremamente valioso o apoio generoso que me dispensou ao longo de um convívio científico gratificante que culminou nesta tese e sem o qual não teria sido possível a sua realização.

À Administração do Hospital de Dona Estefânia, no nome do Dr. Mário Coelho e do Professor Doutor Luís Nunes de quem recebi a total disponibilidade para a execução deste trabalho multi-institucional e permanente incentivo, uma vez que sem meios de diagnóstico não é permitido aos clínicos fazerem investigação.

À Dr.^a Felisberta Barrocas, como directora do Serviço 2 a que recentemente pertenco e como amiga de longos anos, quero agradecer toda a disponibilidade que me proporcionou e sem as quais seria muito difícil a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Lino Rosado agradeço ter acolhido este trabalho, dando-me oportunidade de realizar esta dissertação de Doutoramento na Unidade de Imuno-Hematologia que dirige. Manifesto a minha gratidão aos colegas e bons amigos desta Unidade que com esforço suplementar, supriram as minhas ausências e pelas opiniões e conselhos válidos trocados em conversas informais.

Ao Professor Doutor Sashikanta Kaku, aos Drs. Francisco Abecassis, J. Rosado Pinto, Edmar Oliveira, João Lavinha, Constança Jordão e Arlindo Baptista por terem permitido que a investigação decorresse nos Departamentos e Serviços que dirigiam durante a realização deste estudo.

Ao Dr. Carlos Nazário, do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Dona Estefânia, um agradecimento especial pelo grande empenho e rigor no estudo laboratorial e a todos os médicos e técnicos deste Serviço expresso os meus agradecimentos pela disponibilidade e colaboração prestadas.

À Dr.^a Teresa Seixas e à Dr.^a Armandina Miranda, agradeço o carinho com que me acolheram e prestaram a sua preciosa e competente ajuda nas técnicas de Laboratório de Hematologia do Centro de Biopatologia do INSA Dr. Ricardo Jorge a quem devo apoio, entusiasmo e amizade.

À D. Anália Matos, técnica de cardiopneumografia do Hospital de Dona Estefânia, a quem devo a sua preciosa ajuda na parte da execução prática do trabalho de Laboratório da Função Respiratória, sem a qual este não teria sido possível realizar-se.

Aos Drs. Maria Eulália Calado, Graça Nogueira, José Ribeiro, Júlia Duarte e Lara Caeiro, colaboradores na execução técnica desta investigação pela disponibilidade e amizade.

À Dr.^a Ana Luísa Papoila, do Departamento de Biostatística da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa a quem agradeço o esforço em aceitar a elaboração do tratamento estatístico, numa altura que não lhe era propícia. A sua compreensão matemática deste estudo e sensibilidade associadas às sugestões de inigualável importância, foram fundamentais para a concepção desta dissertação.

À Dr.^a Orquídea Freitas colega e amiga, sempre disponível e atenta, pela troca preciosa de ideias, pelas sugestões para o texto nos múltiplos aspectos nele envolvidos o meu manifesto reconhecimento e amizade.

À Dr.^a Judite Baptista por ter sempre acreditado na realização deste trabalho, pela paciência que me dispensou nos momentos de maior desânimo, pela ajuda valiosa na elaboração deste texto, a quem agradecer seria dizer muito pouco; aqui fica o testemunho da minha grande amizade.

Aos meus primos e grandes amigos António José pela preciosa colaboração na análise estatística e à Rosário pela ajuda na revisão do texto, bem hajam.

Por último, ao Carlos e aos nossos filhos, pela paciência, compreensão e ternura com que aturaram os meus desânimos, a quem este trabalho mais exigiu, e que estimularam sempre a sua conclusão. Penalizo-me pelas horas de vazio em que os deixei e dedico-lhes este trabalho.

Ao João, que me iniciou na aprendizagem dos programas de informática e pela sua valiosa ajuda no processamento dos dados e programação do texto. Foi o meu melhor colaborador e com quem muito aprendi.

Ao Pedro, que foi o responsável pela elaboração da capa e das imagens deste texto quero agradecer a sua ajuda.

E ao Miguel, meu filho mais velho com Síndrome de Down, que tantas vezes me disse: "Mãe não fiques triste, eu sei que vais conseguir...", era tão pura, convicta e estimulante a sua afirmação que a minha responsabilidade em não o desiludir foi enorme.

ÍNDICE

Índice de Quadros.....	XXI
Índice de Figuras.....	XXIII
Abreviaturas.....	XXV
Preâmbulo.....	XXVII
Aspectos Históricos.....	XXIX
 PRIMEIRA PARTE.....	 1
Introdução.....	3
Revisão Bibliográfica.....	11
Fisiopatologia.....	11
Principais complicações.....	23
Indicadores de prognóstico.....	30
Factor protector da ACF.....	32
 SEGUNDA PARTE.....	 35
Investigação.....	37
Objectivos.....	39
Doentes e métodos.....	41
Resultados.....	63
Discussão.....	109
Conclusões.....	143
Sugestões – Estado da Arte.....	147
 Resumo.....	 151
Summary.....	155
Bibliografia.....	159
Anexos.....	191

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I.	Distribuição das idades por sexo	65
Quadro II.	Estrato socio-económico dos doentes	66
Quadro III.	Distribuição dos haplotipos da β^S - globina	67
Quadro IV.	Distribuição das deleções da α -talassémia	68
Quadro V.	Parâmetros hematológicos até à data da realização do estudo	69
Quadro VI.	Características hematológicas durante o período de estudo	70
Quadro VII.	Fenotipo clínico dos doentes até à data da realização do estudo	71
Quadro VIII.	Fenotipo clínico dos doentes durante o período de estudo	72
Quadro IX.	Estudo bioquímico durante o período de estudo	73
Quadro X.	Relação entre os haplotipos e os valores da HbF	73
Quadro XI.	Comparação entre os doentes e o grupo de controlo	77
Quadro XII.	Parâmetros electrocardiográficos de acordo com o sexo	87
Quadro XIII.	Parâmetros ecocardiográficos de acordo com o sexo	88
Quadro XIV.	Alterações detectadas por RMN-CE de acordo com o sexo	92
Quadro XV.	Classificação dos resultados do DTC segundo os critérios de Adams	98
Quadro XVI.	Comparação entre os resultados do DTC e da RMN-CE	101
Quadro XVII.	Comparação dos resultados das metodologias utilizadas no estudo do SNC	102
Quadro XVIII.	Características pré-tratamento dos doentes elegíveis para o estudo com HU ..	103
Quadro XIX.	Resposta dos parâmetros hematológicos à terapêutica com HU	106
Quadro XX.	Parâmetros bioquímicos antes e durante a terapêutica com HU	108
Quadro XXI.	Ensaio clínico pediátrico da hidroxiureia na ACF	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura A.	Esfregaço de sangue do primeiro doente com anemia de células falciformes.....	XXIX
Figura B.	Hemograma com a data de 31 de Dezembro de 1904 de Walter Clement Noel, primeiro doente em quem se descreveu a anemia de células falciformes...	XXX
Figura 1.	Principais mecanismos responsáveis pela perda de potássio e água nas células falciformes.....	13
Figura 2.	Principais interações responsáveis pela adesão das células falciformes ao endotélio microvascular.....	15
Figura 3.	Mecanismos de acção da hidroxiureia.....	22
Figura 4.	Distribuição da origem geográfica.....	66
Figura 5.	Comparação entre os haplotipos e os valores da HbF.....	74
Figura 6.	Comparação entre a razão das cadeias γ e a percentagem da HbF (A) e a sua correlação (B).....	75
Figura 7.	Comparação entre o número de EVO e os valores da HbF.....	76
Figura 8.	Comparação entre as provas da função pulmonar da 1ª avaliação dos doentes e o GC.....	78
Figura 9.	Comparação entre as provas da função pulmonar dos doentes entre a 1ª e a 2ª avaliação.....	79
Figura 10.	Comparação entre a SatO_2 e a PaO_2 entre o grupo de controlo e a 1ª avaliação dos doentes e entre a 1ª e 2ª avaliação dos doentes.....	80
Figura 11.	Dispersão dos valores hematológicos em relação à doença pulmonar restritiva.....	82
Figura 12.	Alterações fibróticas residuais encontradas num doente com 13 anos de idade.....	85
Figura 13.	Imagens reticulares no lobo superior do pulmão direito, com moderado enfisema retráctil num doente com oito anos de idade.....	86
Figura 14.	Imagem de densificação parenquimatosa com broncograma aéreo no lobo inferior do pulmão esquerdo (↘) e alterações reticulares com áreas em “vidro despolido” no lobo inferior do pulmão direito (↗).....	87
Figura 15.	Parâmetros ecocardiográficos das DVE em função da concentração da Hb média em g/dL (à esquerda), percentagem da HbF (à direita) e percentagem da HbS (em baixo).....	90
Figura 16.	Enfartes isquémicos bilaterais múltiplos na substância branca profunda com predomínio anterior num doente do sexo masculino com 19 anos de idade.....	93
Figura 17.	Atrofia cortical e sub-cortical traduzida por ventriculomegália e acentuação dos sulcos corticais num doente do sexo feminino com 15 anos de idade.....	93
Figura 18.	Corte sagital onde se observa atrofia cerebelosa, vermiana e hemisférica sem enfartes silenciosos, numa doente com oito anos de idade.....	93
Figura 19.	Acentuada atrofia cerebelosa à esquerda na mesma doente mas em corte axial.....	93
Figura 20.	Enfarte médio no hemisfério cerebeloso paramediano à direita, sem aparente compromisso do andar supratentorial numa doente com 11 anos.....	94
Figura 21.	DTC: razão ACA/ACM $>1,2$ num doente do sexo masculino assintomático.....	96
Figura 22.	DTC: velocidade média de 196 cm/segundo na artéria cerebral média esquerda, num doente com 15 anos de idade.....	97
Figura 23.	TCAR sem enfates esquémicos aparentes mas com sinais de marcada atrofia cortical difusa com predomínio anterior, num doente com 15 anos de idade.....	98
Figura 24.	Imagem da angioRM do mesmo doente onde se observam, estenose marcada e irregularidades das porções supra-clinoideias dos sifões carotídeos em segmentos das artérias cerebrais médias e cerebrais anteriores.....	98
Figura 25.	Comparação entre os testes psicológicos nos doentes e o GC.....	105
Figura 26.	Resposta clínica à terapêutica com HU.....	105
Figura 27.	Resposta dos parâmetros hematológicos à terapêutica com HU.....	107

ABREVIATURAS

ACF	– Anemia de células falciformes
ACF SS	– Anemia de células falciformes forma homozigótica
ACM	– Artéria cerebral média
ACA	– Artéria cerebral anterior
AFR	– Avaliação funcional respiratória
AS	– Traço falciforme
AVC	– Acidente vascular cerebral
CHGM	– Concentração da hemoglobina globular média
CSSCD	– <i>Cooperative Study of Sickle Cell Disease</i>
JCS	– <i>Jamaican Cohort Study</i>
DCF	– Doença de células falciformes
DPR	– Doença pulmonar restritiva
DPCF	– Doença pulmonar crônica falciforme
DTC	– Ultrassonografia por Doppler transcraniano
DVE	– Dilatação do ventrículo esquerdo
DVD	– Dilatação do ventrículo direito
EVO	– Episódio vaso-oclusivo
ES	– Enfarte silencioso
Hb	– Hemoglobina
HbA	– Hb do adulto
HbF	– Hb fetal
HbS	– Hb falciforme
HGM	– Hemoglobina globular média
HU	– Hidroxiureia
OMS	– Organização mundial de saúde
PCR	– Proteína c reactiva
RMN-CE	– Ressonância magnética nuclear crânio-encefálica
RTR	– Regime transfusional regular
STA	– Síndrome torácica aguda
SDMO	– Síndrome de disfunção multi-orgânica
VGM	– Volume globular médio
$\beta^S\beta^S$	– Homozigotia para o gene falciforme
$\beta\beta^S$	– Heterozigotia para o gene falciforme

Função respiratória

Foram adoptadas as regras propostas pela *European Respiratory Society*. De acordo com o último consenso sobre padronização da avaliação funcional respiratória [Eur Respr J 1993; 16 6(suppl.16)], os doze países da Comunidade Europeia, comprometeram-se a usar as abreviaturas propostas nesse documento, que

passaram a ser iguais para todos, e a usar a designação por extenso, consignadas no mesmo documento, na língua nacional.

TLC_{He}	- Capacidade Pulmonar Total por difusão com hélio.
FEV_1	- Volume Expiratório Forçado em 1 segundo.
FEV_1 / FVC	- FEV_1 em percentagem da Capacidade Vital Forçada.
DL_{CO}	- Capacidade de Difusão Pulmonar pelo monóxido de carbono.
O_2	- Oxigénio
He	- Hélio
PaO_2	- Pressão arterial de oxigénio.
P_{ACO}	- Pressão alveolar de monóxido de carbono
$SatO_2$	- Saturação arterial da Hb em oxigénio

PREÂMBULO

Durante o curso de Medicina, na Universidade de Lourenço Marques, fui convidada pelo Professor Doutor Carlos Manso para participar no ensino básico da cadeira de Química Fisiológica, a minha primeira e muito gratificante experiência pedagógica.

Esta oportunidade permitiu-me o contacto com o universo da investigação laboratorial, a percepção da sua exigência, em termos de disciplina e de responsabilidade, não tendo na altura sido possível a minha dedicação exclusiva a esta área da medicina.

No entanto, ficou a semente e o desejo de, num futuro não muito longínquo, desenvolver um trabalho de investigação clínica.

Na fase inicial da minha formação médica considerei que esta era conciliável com o ensino. Mais tarde admiti o mesmo em relação à investigação e à clínica.

É assim que, anos volvidos, já como elemento do quadro permanente do Hospital de Dona Estefânia, regresso ao ensino, agora a convite do Professor Doutor Nuno Cordeiro Ferreira.

Logo que ingressei no Hospital de Dona Estefânia, com o objectivo de ser médica pediatra, emergiu em mim o gosto pela Hematologia Pediátrica. Tive o privilégio de ser colocada numa enfermaria com patologia predominantemente do foro hematológico e de participar também na Consulta de Hematologia, da qual anos mais tarde viria a ser responsável.

A Consulta de Hematologia foi a primeira consulta de especialidade do Hospital de Dona Estefânia. Teve início em Dezembro de 1969 e conta, de então até à data, com cerca de um total de 7.000 doentes. Desde os primórdios da consulta que existe uma ligação com utentes de origem africana, sendo a Anemia de Células Falciformes uma das hemoglobinopatias mais frequentes entre os nossos doentes.

As crianças com Anemia de Células Falciformes são, só por si, um desafio para qualquer médico, pelo sofrimento que as acompanha durante toda a vida, pelo estoicismo com que enfrentam as crises, pela resignação e esperança com que encaram a doença, suscitando-me uma grande ternura e respeito.

Por outro lado, a doença crónica adquire nos nossos dias, uma importância crescente, quer sob o ponto de vista do sistema de saúde em geral, quer na qualidade dos serviços de saúde em particular. Cramer (1993, 1994) define Saúde como um bem-estar físico, mental e social, completo e não apenas a ausência de doença. Aliás, esta tinha sido já a definição de Saúde adoptada pela Organização Mundial de Saúde aquando da sua constituição em 1948.

O progresso do conhecimento e o avanço da tecnologia vieram permitir o estudo da história natural da Anemia de Células Falciformes e, com eles, gerou-se a convicção de que um grande número de complicações desta doença poderia ser evitado ou minimizado com a consequente melhoria da qualidade de vida dos doentes que dela padecem.

O estudo até aqui desenvolvido e agora apresentado foi árduo, o sonho grande e o mundo da investigação clínico-laboratorial revelou-se fascinante.

A memória de África, em particular da África de expressão portuguesa, que vive dentro de mim com tanta nostalgia, ajudou-me nos momentos difíceis a prosseguir este trabalho que tem sido gratificante e, em muito, tem contribuído para a minha realização profissional.

No entanto, esta só será plena se tiver contribuído para o avanço dos conhecimentos na prevenção das complicações da Anemia de Células Falciformes e deste modo melhorar a qualidade de vida de estas crianças, portadoras de uma doença crónica e paradigma da dor, às quais desde há muito dedico toda a minha atenção e conhecimento.

ASPECTOS HISTÓRICOS

A Anemia de Células Falciformes foi conhecida durante gerações na África Ocidental por nomes onomatopeicos que descreviam a natureza repetitiva das crises dolorosas, as quais são o protótipo da doença.

Teve o primeiro testemunho em África, em 1874, por Africanus Horton que se lhe referiu como "a febre das crises associadas a uma constante anomalia do sangue".

Em Novembro de 1910, surge na América do Norte o primeiro registo da doença feito por James Herrick, num artigo intitulado "*Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia*".

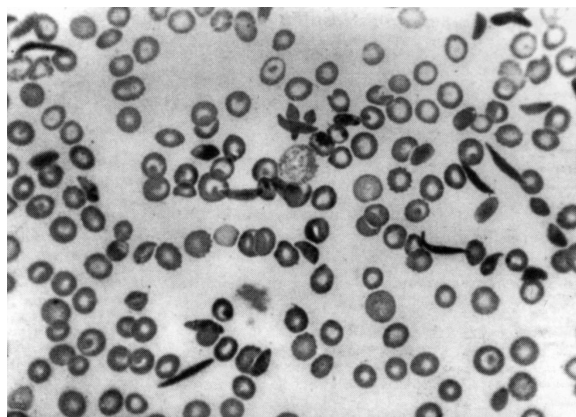


Figura A. Esfregaço de sangue do primeiro doente com anemia de células falciformes. Adaptada de JB Herrick 1910 ⁽¹⁷⁰⁾.

O autor descreve o aparecimento de glóbulos vermelhos em "forma de foice" no esfregaço de sangue de um estudante africano da escola de Medicina Dentária de Chicago, Walter Clement Noel, com 20 anos de idade, natural de Granada, que sofria de anemia grave - Figura A ⁽¹⁷⁰⁾.

Reconhece, no entanto, não poder dizer, de momento, "se o quadro hematológico, representa meramente uma poiquilocitose caprichosa, ou depende de qualquer estado químico ou físico do sangue, ou se é característica de alguma doença especial".

Este doente era descendente de uma família saudável e foi internado no Hospital Presbiteriano, em Chicago por síndrome torácica aguda e veio a falecer aos 32 anos (02/05/1916) por uma insuficiência respiratória com cor pulmonale, o que se confirmou mais tarde.

The Presbyterian Hospital, Chicago, Ill.
EXAMINATION OF BLOOD.

Case Number _____ Date *12/31*, 190*4*
 Name of Patient *Noel* Room or Ward *7*

MACROSCOPICAL AND QUANTITATIVE.

Appearance *pale* Coagulability _____
 Erythrocytes per cu. mm. (Thoma Zeiss) *2,880,000*
 Leucocytes per cu. mm. (Thoma Zeiss) *15,250*
 Hemoglobin (Von Fleischl) *50%* *Corrected* *3700 cells per mm.*
 Specific gravity _____ *(27% water)* *small ref. cells (under 1000 reds)*
 Color index _____ *(red count prepared)*

MICROSCOPICAL.
Fresh Specimen.

Erythrocytes—Color _____ Shape *very irregular many elongated*
 Size *irregular - many large* Rouleaux formation *some*
 Leucocytes—Apparent increase in number _____
 Ratio of granular to non-granular _____

Fibrin _____ Blood platelets _____
 Plasmodium malariae _____
 Microorganisms _____

Figura B. Hemograma com a data de 31 de Dezembro de 1904 de Walter Clement Noel, primeiro doente em quem se descreveu a anemia de células falciformes. Adaptado de JB Herrick 1910⁽¹⁷⁰⁾

A Figura B mostra o resultado do hemograma, em que entre outros registos, se observa o desenho dos eritrócitos sendo referida a sua forma muito irregular e alongada.

Várias publicações se sucederam até que, em 1922, Mason usa o termo de anemia de células falciformes, *sickle cell anemia*, nome porque é hoje universalmente conhecida⁽²⁴⁶⁾.

Mas a história da anemia de células falciformes começa em 1917, quando Emmel demonstra in vitro a falciformação dos glóbulos vermelhos nestes doentes e descreve pela primeira vez, a base genética da falciformação⁽¹¹⁵⁾.

Posteriores estudos em 1923 e 1924 realizados por Sydenstricker, Mulherin e Housel, descrevem os primeiros casos em crianças, reconhecem a associação com anemia hemolítica, e introduzem o termo “falciformação latente” para descrever a cor peculiar das escleróticas ^(434, 435).

Em 1925, Castana's, relata o primeiro caso de anemia de células falciformes numa criança do sexo feminino de origem caucasiana e, até 1942, foram publicados 17 casos todos com a mesma origem, o que rebate o conceito, até então errado, de que a doença era confinada apenas à população africana ⁽⁷¹⁾.

A base patológica da doença e a sua relação com a molécula de hemoglobina foram definidas, em 1927, por Hahn e Gillespie que demonstraram estar a falciformação dos eritrócitos relacionada com a baixa da pressão arterial de oxigénio ⁽¹⁵⁹⁾.

Em 1929, Steiberg faz uma revisão geral e histórica da anemia de células falciformes e descreve a doença de um modo global nos seus aspectos fisiopatológicos e clínicos ⁽⁴¹²⁾.

Linus Pauling *et al.*, em 1949 usando uma nova técnica de electroforese, refere-se à anemia de células falciformes como a primeira doença na qual a alteração de uma proteína lhe confere uma mobilidade electroforética diferente e responsável pela doença. Esta descoberta foi o ponto de partida para o estudo molecular ⁽³¹⁹⁾.

Mais tarde, em 1951, Neel define a genética da doença e distingue o traço falciforme, heterozigóticos (AS) da forma anemia de células falciformes, homozigóticos (SS). A saga da anemia de células falciformes é apresentada como um modelo genético e a sua transmissão mendeliana foi conhecida mesmo antes da era molecular ⁽²⁹⁵⁾.

Vernon Ingram em 1957 analisa as diferenças estruturais entre as duas hemoglobinas, e usando a técnica de *fingerprint* demonstra a substituição na posição 6 da cadeia β -globina, do ácido glutâmico pela valina. Esta substituição explica-se por uma alteração nucleótida ao nível do códon tripleto $\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$, que codifica a hemoglobina falciforme. Estava assim definida a mutação na doença das células falciformes ⁽¹⁸⁶⁾.

As manifestações clínicas da anemia de células falciforme com diversas definições são referidas por Konotey-Ahulu em 1974⁽²⁰⁸⁾ ao mesmo tempo que descreve num doente as crises falciformes dolorosas típicas desta patologia.

A noção de enfarte pulmonar na anemia de células falciformes, foi percebida quando Graham, em 1924, Woostein e Kreidel, em 1928, e Steinberg, em 1929, observaram trombos de sangue fresco e organizado consequentes a enfartes recentes e antigos, nos pequenos e médios vasos do pulmão que Steinberg descreve, como áreas de densificação com limites bem definidos que traduz uma pneumonia organizada com fibrose em alguns alvéolos ⁽⁴¹²⁾.

A doença pulmonar crônica falciforme com cor pulmonale foi descrita pela primeira vez por Yater e Hansmann em 1936 ⁽⁵⁰⁵⁾ e mais tarde, em 1951, reconhecida como uma complicação crônica da anemia de células falciformes numa revisão que Margolies fez da doença ⁽²⁴⁹⁾.

O envolvimento do sistema nervoso central na anemia de células falciformes, referido por Sydenstricker cerca de 13 anos após a primeira descrição da doença num rapaz com quatro anos de idade com convulsões, rigidez da nuca e hemiparésia, chamou a atenção para as manifestações de défices neurológicos agudos frequentes nesta hemoglobinopatia ^(434, 435).

Deve-se, no entanto, a Hughes em 1940 a primeira grande revisão de toda a bibliografia sobre o sistema nervoso central na anemia de células falciformes, que marcou a importância das complicações cerebrovasculares e fez referência aos principais tipos de manifestações do sistema nervoso central ⁽³⁹³⁾.

Janet Watson afirma em 1948 que a pobreza de células falciformes no sangue periférico dos recém-nascidos com anemia de células falciformes era devido à presença de hemoglobina F nos eritrócitos, os quais eram desprovidos de hemoglobina falciforme anormal, definindo deste modo o papel protector desta hemoglobina ⁽⁴⁸⁵⁾.

Em 1984, o transplante da medula óssea numa criança com anemia de células falciformes deve-se a Jonhson: foi o primeiro caso de cura registado em que o transplante se fez para tratar uma leucemia aguda e que curou ao mesmo tempo a doença ⁽¹⁹¹⁾.

A hidroxiureia foi, até à data, a primeira e a única terapêutica preventiva das complicações da anemia de células falciformes confirmada pelo *Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia* ⁽⁷⁶⁾.

Presentemente, procura-se explicar o extremo polimorfismo da expressão clínica da anemia de células falciformes, pela influência de factores moduladores e epistáticos, susceptíveis de modificar o seu esquema fisiopatológico.

Investigadores Portugueses

Não se pode deixar de homenagear, no âmbito deste estudo, alguns dos investigadores portugueses que se esforçaram e dedicaram o seu saber ao estudo da anemia de células falciformes. Desta investigação resultaram importantes orientações para futuros estudos na área da Hematologia Pediátrica, alguns dos quais são citados nesta dissertação.

As primeiras publicações de hemoglobinopatias em Portugal devem-se a M Cordeiro Ferreira que, em 1938, descreve dois casos clínicos de anemia de Cooley⁽⁸⁴⁾.

Mais tarde, em 1942, C Trincão e J Rolo fizeram a revisão na literatura da anemia de células falciformes e apresentaram três casos particulares em crianças de uma família de portugueses ⁽⁴⁴⁴⁾.

Até 1949 a drepanocitose foi a única hemoglobinopatia conhecida em Cabo Verde, Guiné, S. Tomé e Príncipe, Angola e Moçambique e o seu diagnóstico era baseado na falciformação dos eritrócitos. Dado o aumento contínuo do número de hemoglobinas anormais, C Trincão, LT Almeida Franco, MP Coutinho Gomes e N Cordeiro Ferreira, em 1958, fizeram uma revisão das estatísticas publicadas usando a associação do teste de falciformação com a nova técnica de electroforese pH 8,6. Estudaram 2.279 nativos, tendo verificado erros devidos a pseudofalciformação e à existência de outras variantes da hemoglobina na Ilha do Príncipe: C, SC e K ⁽⁴⁴⁵⁾.

C Trincão, em 1961 abordou a hemoglobina anormal, especificamente a HbS e teceu excelentes comentários sobre a distribuição da hemoglobina S em Portugal e o seu predomínio no sul do país ⁽⁴⁴⁶⁾.

P Valadas, C Trincão, J Martins de Melo em 1964 após o diagnóstico da associação da Talassémia-Drepanocitose em duas famílias residentes no Alentejo fizeram algumas considerações sobre a microdrepanocitose nesta patologia ⁽⁴⁵¹⁾.

JM Melo, em 1966, durante o estudo para a caracterização de uma microdrepanocitose numa família alentejana, verificou a particular incidência da HbS

nesta região. Reflectiu sobre a origem e dispersão do gene S, o qual afecta provavelmente e de um modo geral todo o sul da Península Ibérica ⁽²⁵⁵⁾.

C Trincão, J Martins de Melo, PA Lorkin e H Lehmann, em 1968, relataram o caso de uma família, no sul de Portugal, com uma hemoglobina rara entre nós: a hemoglobina J Paris. Esta hemoglobina foi encontrada num doente descendente de espanhóis que viviam em Paris. O facto de esta hemoglobina anormal ser encontrada numa família portuguesa do Algarve sugere fortemente a sua transmissão pelos Árabes ⁽⁴⁴⁷⁾.

Em 1977 C Manso, N Almeida, M Azevedo, abordam o diagnóstico clínico e laboratorial das hemoglobinopatias, nomeadamente Talassémias e Drepanocitose nos Bantus de Moçambique, dando relevo à importância da electroforese da hemoglobina alkali resistente.

No mesmo ano, MG Gomes da Costa, N Cordeiro Ferreira e J Tribuna, após uma pequena introdução, fazem as primeiras descrições clínicas da doença numa extensa revisão sobre a drepanocitose, nome pelo qual a anemia das células falciformes era correntemente designada nesta época ⁽¹⁵²⁾.

R Valadas Preto, M Simões de Carvalho, F Graça, AM Baptista, MA Pérez Fernández, AR Nogueira et al., em 1980, conscientes das diferenças acentuadas tanto da evolução, como da expressão laboratorial na anemia da drepanocitose e da sua grande diversidade, estudaram-na em 26 doentes drepanocíticos usando metodologias com radionucleótidos de que tinham experiência. Os resultados permitiram concluir que havia uma diminuição da actividade da medula e da hemólise ⁽⁴⁵²⁾.

MC Martins, MO Rodrigues e MM Palma apresentam, em 1988, os primeiros resultados sobre um rastreio que fizeram para hemoglobinopatias e deficiência em G6PD, na comunidade Caboverdiana residente em Lisboa. Nesta, a prevalência é comparável à dos portadores de HbS no distrito de Coruche e Alcácer do Sal onde se atingem frequências polimorfos de 5 a 6% ⁽²⁵⁰⁾.

A Brás e LB Braga, ainda em 1988, após referência à constituição da hemoglobina humana normal e à mutação determinante da drepanocitose, descrevem a fisiopatologia necessária para a compreensão da clínica e da terapêutica. Apresentam propostas de protocolos de diagnóstico e terapêutica e, por fim, abordam as medidas preventivas adequadas à anemia de células falciformes ⁽⁶⁰⁾.

C Monteiro, J Rueff, AB Falcão, S Portugal, DJ Weatherall e AE Kulozik, em 1989, num estudo feito no concelho de Coruche no Alentejo, onde a frequência da mutação β^S é de 4%, concluíram que o gene β^S foi importado de África e reflecte a extensão das viagens marítimas dos portugueses. A sua amplificação deve-se à vantagem selectiva dos heterozigóticos numa área endémica da malária ⁽²⁷²⁾.

H Carreiro, LB Braga e G Gomes da Costa, em 1989, procedem a uma breve revisão dos defeitos moleculares, fisiopatológicos clínicos e laboratoriais da α -talassémia e caracterizam as medidas terapêuticas e preventivas possíveis nesta situação. Abordam as eventuais associações, entre as quais da α -talassémia com a drepanocitose ⁽⁶⁸⁾.

Ainda em 1989, P Faustino, J Gonçalves, L Osório-Almeida, L Romão e J Lavinha, avaliam a praticabilidade do diagnóstico pré-natal (DPN) da β -talassémia e talassodrepanocitose, na população residente em Portugal, por associação dos polimorfismos de restrição no agrupamento génico da β -globina com as mutações β -talassémia prevalentes na mesma população. Os resultados indicam um aumento de 8 e 3%, respectivamente, do diagnóstico pré-natal com esta metodologia em relação à detecção directa de mutações por si só ⁽¹²⁴⁾.

Em 1990, A Esaguy, CM Amaro, MJ Ribeiro e PC Gomes, após a descrição de um caso de drepanocitose num lactente, diagnosticado aos 40 dias de vida, chamam a atenção para a necessidade do diagnóstico pré-natal e do rastreio do recém-nascido, dada a sua importância para a instituição precoce de uma profilaxia antibiótica nestas situações ⁽¹¹⁸⁾.

J Lavinha, J Gonçalves, P Faustino, L Romão, L Osório-Almeida, MJ Peres *et al.*, em 1992, com o contributo da epidemiologia molecular, sugerem que o traço falciforme foi importado duas vezes de África: através do Mediterrâneo nos séculos VIII e XIII e via Atlântico, no século XV ⁽²²⁴⁾.

MC Martins, G Olim, HA Magalhães e MO Rodrigues, em 1993, fazem um estudo nacional prospectivo para avaliarem a prevalência das hemoglobinopatias em Portugal. Os resultados mostram frequências baixas: β -talassémia (0,45%), portadores da HbS (0,32%) e deficiência da G6PD (0,51%), com uma distribuição preferencial no sul do país ⁽²⁵¹⁾.

GP Tamagnini e LS Ribeiro num estudo multi-institucional internacional realizado em 1992, deram o seu contributo para o estudo dos haplotipos da β^S globina em várias populações, incluindo em Portugal. A metodologia usada foi rápida, pouco dispendiosa e permitiu a reunião de um grande número de dados em tempo limitado⁽³¹³⁾.

Em 1993, F Inez, T Seixas, P Pacheco, J Lavinha, MJ Feijoó, C Martins et al., com o objectivo de prevenir o aparecimento de novos casos de hemoglobinopatias major lançaram um programa de rastreio orientado nos sete distritos do centro e sul do país, onde o Programa Nacional de Controlo das Hemoglobinopatias está implementado⁽¹⁸⁵⁾.

S Lamy, LB Braga, P Pacheco, J Lavinha, G Gomes da Costa, N Cordeiro Ferreira em 1995, esclarecem a prevalência das doenças hereditárias do eritrócito nas hemoglobinopatias tanto a nível mundial, europeu, nacional assim como na consulta de hematologia do Hospital de Dona Estefânia. Realçam-se os aspectos que condicionam a morbilidade associada a estas doenças crónicas e referem as atitudes consensuais do ponto de vista profiláctico e terapêutico. Consideram a grande importância dos diagnósticos pré e pós-natal na anemia das células falciformes⁽²¹⁹⁾.

Em 1996, MJ Peres MH Carreiro, MC Machado, T Seixas, I Picango e L Batalha, realizam um estudo piloto de rastreio para as hemoglobinopatias em 400 recém-nascidos numa maternidade da região de Lisboa no qual não foi identificada nenhuma forma de $\beta^S\beta^S$ e apenas seis (1,5%) eram portadores de HbS. Este estudo da incidência da α -talassémia deleccional mostrou que 10% eram portadores da deleção de um gene e 4% eram portadores da triplicação dos genes α -globina. Por fim discutem a aplicabilidade do rastreio neonatal em Portugal⁽³²⁶⁾.

Em 1999, H Vassel, A Ferrão e A Morais, fazem uma análise retrospectiva (1982--1997) da drepanocitose referente à Unidade de Hematologia do Hospital de Santa Maria, em Lisboa e avaliam as complicações agudas e crónicas desta doença, em que 39 doentes (86%) são portadores de anemia de células falciformes e destes, nove (20%) são de origem caucasiana, abrangendo um grupo etário até aos 21 anos de idade⁽⁴⁵⁵⁾.

G Rocha, E Cleto, L Vale, L Pinho e E Coimbra, em 2000, fazem uma revisão de quatro casos de anemia de células falciformes em crianças residentes no norte de Portugal, onde esta patologia é rara, em termos globais. Destes, apenas um doente

apresentava uma evolução grave, sendo que nos restantes, os valores de HbF situavam-se entre 10,9 e 17,6%, o que permite uma qualidade de vida perto da normalidade ⁽³⁶⁵⁾.

Num artigo muito recente, da autoria de P Rodrigues, F Maltez, J Machado e R Proença, publicado em 2004, descreve-se um caso invulgar e muito raro de complicação ocular grave numa forma heterozigótica, podendo inferir-se que esta forma, apesar de ser considerada aparentemente benigna, pode em determinadas situações revestir-se de uma gravidade não esperada ⁽³⁶⁹⁾.

PRIMEIRA PARTE

Introdução

Revisão Bibliográfica

INTRODUÇÃO

A Anemia de Células Falciformes (ACF) foi descrita pela primeira vez como entidade clínica no início do século XX e ainda hoje constitui um dos mais importantes problemas hematológicos que os pediatras enfrentam na sua prática clínica diária.

Definida como uma hemoglobinopatia de estrutura devida a uma única mutação nas cadeias da β -globina, é sem dúvida a mais frequente das doenças monogénicas e a que apresenta maior distribuição mundial.

No continente africano, onde é grande a mortalidade nos primeiros anos de vida por infecção e má nutrição, foi ignorada durante séculos e somente quando aquela baixou em consequência de uma melhoria das condições de vida e do desenvolvimento dos cuidados primários de saúde, a ACF emergiu do *iceberg* das doenças genéticas.

As primeiras observações sugeriam que o gene β^S estava apenas confinado à população da África Equatorial e aos descendentes da África Ocidental no Novo Mundo. Porém, hoje sabe-se que a sua distribuição é mundial e não se encontra ligada a uma origem geográfica, sendo antes determinada pelo fluxo do gene β^S e sua selecção pela malária, desde que esta se tornou endémica, há cerca de 10.000 anos (131, 392).

O uso de técnicas moleculares em investigação epidemiológica mostrou que a malária é a explicação para a prevalência das hemoglobinopatias, sendo a HbS o melhor exemplo, na população humana, de um polimorfismo balanceado (1, 238, 288).

Calcula-se que a mutação β^S tenha surgido há cerca de 3.000-6.000 gerações. Sob o ponto de vista histórico, formularam-se duas teorias para explicar a sua distribuição (289, 392):

- Segundo Lehmann, a mutação ocorreu apenas uma única vez no período neolítico, na então fértil península Arábica, mas a transformação desta num deserto deu origem a fenómenos migratórios das populações com propagação do gene $\beta^{S(392)}$.

- Kan e Dozy, em 1978, identificam a primeira endonuclease de restrição (Hpa I) o que lhes permitiu reconhecer o primeiro polimorfismo do ADN (haplotipo) e mais

tarde, em 1980, relacionar este polimorfismo com a mutação da β^S -globina. Com base no estudo dos haplotipos a origem multicêntrica da ACF foi confirmada e é agora mundialmente aceite ^(24, 316).

Foi através do estudo dos haplotipos que se conheceu o modo de entrada da ACF em Portugal. Ela surgiu entre o século VIII e o século XIII, de forma esporádica, introduzida pelos povos da bacia do Mediterrâneo (fenícios, gregos e romanos), o que explica o predomínio do haplotipo Benin, no sul do nosso país. Em meados do século XV, a introdução da ACF fez-se de uma forma mais intensiva, através do repovoamento do país com escravos oriundos da Guiné, S. Tomé e Príncipe, Costa do Marfim, Angola e mais tarde de Moçambique, portadores dos haplotipos Senegal e Bantu ⁽²²⁴⁾.

Vários são os estudos que se têm feito para avaliar a prevalência e a incidência da ACF no mundo. De acordo com estudos realizados em 1983 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 60.000 milhões de pessoas no Mundo eram portadoras do traço falciforme e, dessas, 50.000 milhões estavam em África. Em 1992 este valor subiu para 78.000 milhões ^(291, 293).

Dada a importância desta doença, o Grupo de Trabalho Europeu para as hemoglobinopatias, sob a égide da OMS, organizou duas reuniões em 1986 (Bruxelas) e em 1987 (Paris), onde se abordou a prevalência que estas doenças apresentam nas várias regiões do globo ⁽³⁶¹⁾.

Assim, calcula-se que cerca de 44% da população africana seja portadora de um dos genes patológicos, o mesmo se passando com 34% da população asiática, 6% da população americana, 1,4% da população da Oceânia e 1% da população europeia⁽⁸²⁾.

Quanto ao número de homozigóticos, estima-se que cerca de sete a oito em cada 1.000 crianças nascidas no continente africano serão doentes, ou seja nasçam por ano com ACF cerca de 164.000 crianças. Por outro lado, a Europa e a Oceânia têm menor incidência, apresentando cerca de 0,2%, o que se traduziria no nascimento de cerca de 2.000 crianças doentes por ano.

Cingindo-nos ao continente europeu, a distribuição também não é uniforme, havendo uma maior prevalência nos países junto ao Mediterrâneo, nomeadamente a Grécia e a Itália, respectivamente com 9 e 5% da sua população como heterozigota, na ausência de medidas preventivas ⁽²²³⁾.

Nos Estados Unidos da América, a frequência do traço falciforme é de 7 a 9% nos descendentes americanos da população africana sendo de referir que 0,2% desta população tem ACF ou seja, existem cerca de 80.000 doentes no estado de portador da doença ⁽²²⁰⁾.

Em África, dependendo das tribos, a incidência do traço falciforme pode variar, em média, entre 12 a 40% ⁽¹⁰⁹⁾. A doença é aqui menos frequente que nos EUA, provavelmente devido à elevada mortalidade infantil ^(95, 96).

No que respeita a Portugal a prevalência dos portadores do gene β^S na população autóctone portuguesa é de 0,32%, aumentando de 0,1% no norte, até 1,5% no sul do país, atingindo valores máximos de 5 a 6% em Coruche, Alcácer do Sal e Pias, áreas onde a malária foi endémica até meados do século XX ^(251, 272). Esta prevalência deve-se à miscigenação resultante da vinda de escravos africanos nos séculos XV e, recentemente, à migração das populações africanas depois do 25 de Abril ⁽²²⁴⁾.

A ACF, caracterizada por uma grande mortalidade, foi considerada em 1960 como uma doença de crianças, sabendo-se que em aproximadamente 30% dos casos de morte, esta ocorria mesmo antes de se fazer o diagnóstico ⁽³³³⁾.

A susceptibilidade aumentada destes doentes às infecções por *Streptococcus pneumoniae* foi a grande causa de mortalidade em 61% de crianças até aos cinco anos ^(41, 42). No entanto, em 1986, com o início da profilaxia com penicilina oral, foi possível reduzir em 84% a incidência da sépsis pneumocócica ⁽¹⁸¹⁾. Estes resultados foram um grande incentivo para o início do rastreio neonatal e do diagnóstico pré-natal na ACF ^(16, 97, 111, 141, 218, 405, 443, 449, 480).

Decorridos cerca de 30 anos, os grandes avanços nos cuidados de saúde prestados a estas crianças, nomeadamente a introdução das vacinas e a antibioticoterapia ⁽⁴⁵⁸⁾, contribuíram para que a mortalidade diminuísse de 15% para 1%; segundo alguns autores, pelo menos 90% dos doentes com ACF passaram a sobreviver até à 3ª década. Segundo outros autores, 50% dos doentes sobrevivem para além da 5ª década, começando a não ser raro encontrar adultos com 50 ou até mesmo 60 anos ^(95, 96, 225, 227, 333).

A grande importância dos episódios vaso-oclusivos dolorosos (EVO) advém, não só de os mesmos serem responsáveis pela morbilidade da ACF, através da dor severa que domina o quadro clínico, mas também, porque na sua forma subclínica provocam,

em simultâneo, lesões irreversíveis em diferentes órgãos e sistemas que levam a lesão multi-orgânica e ao risco de aparecimento de sequelas a curto ou longo prazo (15, 164, 332, 334, 388). Os órgãos mais afectados são o sistema respiratório e o sistema nervoso central que, quando atingidos, são a causa de grande morbilidade e mortalidade no grupo pediátrico.

A terapêutica analgésica de que dispomos na actualidade minimiza o drama da dor nestas crianças e melhora a sua qualidade de vida.

No entanto, apesar dos avanços da fisiopatologia e da biologia molecular nos últimos 25 anos, a variabilidade das manifestações clínicas durante toda a evolução da ACF, conhecida desde 1950, difere muito entre os doentes e ao longo do tempo no mesmo doente, o que demonstra que a gravidade da doença não pode ser explicada apenas numa base molecular.

Após a sua primeira descrição, publicada em 1910, seguiram-se seis décadas de estudos de pequenas séries sobre a genética e a biologia molecular, a hematologia, a clínica e a fisiopatologia que deram informações importantes, mas isoladas, destes diferentes aspectos da doença.

Em meados dos anos 70, para definir a história natural e caracterizar o impacte sócio-económico da doença de células falciformes (DCF), surgiram dois estudos prospectivos e longitudinais que descreveram pela primeira vez o seu curso clínico e nos deram a oportunidade de avaliar o significado dos indicadores de prognóstico para as complicações e mortalidade da doença.

Nestes dois estudos, um realizado nos Estados Unidos da América e o outro na Jamaica, países onde a incidência da DCF é elevada, predominam os doentes com a variante ACF.

Ambos são estudos multi-institucionais que abrangem grandes séries de doentes, 3.200 e 1.240, e que são, respectivamente, o *Cooperative Study of Sickle Cell Disease* (CSSCD) do *Sickle Cell Disease Branch, National Heart, Lung and Blood Institute's* realizado nos EUA, entre 1978 e 1988 o qual incluiu recém-nascidos, crianças e adolescentes até aos 20 anos de idade ^(12, 140) e o *Jamaican Cohort Study* (JCS), com início em 1973 até 1981 que incluiu recém-nascidos e as suas famílias ⁽³⁹²⁾.

A extrema importância destes estudos deve-se não só ao pioneirismo como às informações que proporcionaram. Foram seguidos por outros igualmente importantes, uns baseados nestes registos e outros isolados.

A título de exemplo citam-se alguns destes estudos: os que versam factores de risco relacionados com os episódios dolorosos ^(158, 440); os preditores da bacteriémia nos episódios febris ^(489, 507); os novos conceitos na avaliação da gravidade clínica ^(263, 378, 389); os enfartes silenciosos como factores de risco para os acidentes vasculares cerebrais ⁽²⁶⁴⁾; os preditores genéticos dos acidentes vasculares cerebrais ⁽¹⁸⁰⁾ e os recentes avanços no diagnóstico e terapêutica das complicações *major* da ACF incluindo a clonagem molecular ^(134, 191, 193, 198, 205, 353, 357, 493).

Na ACF, como em qualquer outra doença crónica, os prejuízos humanos, nos mais diversos componentes, e económicos são sempre elevados, quer em países em desenvolvimento, onde a prevalência das hemoglobinopatias é elevada e onde originam repercussões na saúde pública, quer nos países industrializados, onde estas são estudadas a nível molecular e tratadas com os recursos da medicina moderna.

As hemoglobinopatias, pela sua frequência e variedade, constituem, de facto, um modelo para o desenvolvimento da investigação, permitindo assim ampliar os conhecimentos fundamentais no nosso entender extrapoláveis para outras áreas da medicina.

O modelo de ratos transgénicos da doença de células falciformes, iniciado em 1988, com o objectivo de se compreender a fisiopatologia e os mecanismos de vaso-oclusão, está a ser utilizado no estudo dos factores ambientais e genéticos que contribuem para a heterogeneidade da expressão clínica da doença ^(279, 448). Será mais uma ajuda para identificar novos indicadores de prognóstico e conhecer melhor alguns dos já definidos.

A tentativa de encontrar indicadores de prognóstico que, de algum modo, possam relacionar-se com lesão multi-orgânica, tem despertado grande interesse na investigação. O avanço cada vez maior da fisiopatologia e de novas técnicas aumenta o interesse do conhecimento de outros indicadores que permitam fazer o diagnóstico precoce das lesões, antes que estas se tornem irreversíveis.

A importância do seu conhecimento advém da circunstância de permitirem também a instituição de medidas preventivas profiláticas e de uma abordagem equilibrada de intervenções terapêuticas.

Destas, a hidroxiureia (HU) é já o exemplo de uma investigação eficaz nos adultos e em fase de investigação nas crianças e adolescentes ^(74, 76, 463).

O objectivo desta investigação começou por ser o estudo de indicadores de prognóstico do sistema respiratório, dado que todos os cuidados prestados a estes doentes, bem como a própria investigação, eram quase exclusivamente dirigidos para os aspectos hematológicos da doença.

No entanto os aspectos relacionados com a repercussão no sistema cardiorespiratório, ainda mal conhecidos, reflectem a pouca atenção dada ao pulmão e à circulação pulmonar por parte dos clínicos e investigadores; com efeito o envolvimento pulmonar da ACF é um terreno relativamente pouco explorado, o que permite um enorme leque de oportunidades de investigação, quer clínica quer laboratorial.

Ao ter conhecimento do sumário do Workshop do Sickle Cell Disease Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute realizado em Bethesda, Maryland, em 2 e 3 de Abril de 1992, com o título Pathogenesis of Lung Disease in Sickle Hemoglobinopathies entendi quão importante seria investigar esta área esquecida por pneumologistas, hematologistas e pediatras que lidam com esta patologia e assim contribuir de algum modo para melhorar a qualidade de vida das crianças e adolescentes com ACF ⁽⁴⁸⁸⁾.

Ao debruçar-me sobre o "mundo sem fim" que é a ACF, apercebi-me de que tão grave como a patologia pulmonar era a do sistema nervoso central.

A percepção da importância do envolvimento destes dois territórios no prognóstico da doença determinou que o estudo não se restringisse só ao sistema respiratório, como de início tinha previsto. Achei que era importante e possível estudar estes dois aspectos sem ter de os separar.

Dada a gravidade de algumas formas da ACF e a disponibilidade de uma terapêutica que até à data tem demonstrado ser eficaz na evolução e prognóstico da doença, fiz em simultâneo um estudo de investigação com a hidroxiureia em doentes com as formas mais graves da doença.

De realçar que não está publicado qualquer estudo prospectivo que defina as principais complicações da ACF responsáveis pela morbilidade e mortalidade, na criança e no adolescente, e que investigue, em simultâneo, factores com implicações preventivas na evolução e no tratamento da doença.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FISIOPATOLOGIA	11
Fisiopatologia das complicações pulmonares	17
Fisiopatologia do sistema nervoso central	20
Mecanismos de acção da hidroxiureia	21
PRINCIPAIS COMPLICAÇÕES – ESTADO DA ARTE	23
Síndrome torácica aguda.....	24
Doença pulmonar crónica falciforme.....	27
Sistema nervoso central	28
INDICADORES DE PROGNÓSTICO.....	30
FACTOR PROTECTOR DA ACF – HIDROXIUREIA	32

FISIOPATOLOGIA

Ao proceder-se à abordagem da fisiopatologia da ACF revê-se o seu modelo “clássico” referindo aspectos relacionados com a heterogeneidade clínica e com indicadores de prognóstico.

A HbS ($\alpha_2\beta_2^S$), a primeira de mais de 1.000 mutações genéticas da Hb conhecidas actualmente, tem a propriedade única e própria da variante $\beta^6_{GLU-VAL}$, de se polimerizar quando desoxigenada.

A desoxigenação dos eritrócitos falciformes forma uma solução viscosa no seu interior que leva à polimerização da HbS, processo central da vaso-oclusão e causa primária da sintomatologia clínica ^(60, 119, 194).

Após a desoxigenação da HbS verifica-se um atraso de mili-segundos a segundos, que precede o aparecimento de polímeros detectáveis, depois do qual eles se acumulam exponencialmente. Este período de tempo, *delay time*, é de 30 segundos e inversamente proporcional à 30ª e 50ª potência da concentração da HbS, o que implica que pequenas reduções na concentração da HbS possam ter importantes benefícios clínicos ^(60, 126, 187).

A insolubilidade da HbS é um dos factores responsáveis pela formação de polímeros dentro dos eritrócitos, quando atravessam a microcirculação em situações de hipóxia ^(46, 126).

Porém, mesmo com valores de saturação elevados, a quantidade de polímeros de HbS pode ser suficiente para alterar as propriedades reológicas das células falciformes: maior viscosidade e menor deformabilidade ^(78, 158).

A polimerização depende não só da desoxigenação, mas também da concentração e composição da Hb intra-eritrocitária, da desidratação, do pH ácido e do aumento da temperatura ^(106, 380).

A presença de outras Hb, tal como a hemoglobina fetal (HbF), cuja percentagem varia entre os doentes e, por sua vez, entre os eritrócitos de cada doente, é mais um factor que influencia a heterogeneidade celular: inibe a falciformação, prolongando a sobrevida dos eritrócitos, melhorando a evolução clínica ^(31, 294).

As alterações intracelulares resultantes da formação de polímeros levam à activação dos principais sistemas de transporte de água e potássio, os canais de Gardos, e co-transporte do K-Cl, que originam um efluxo de K e de água com consequente desidratação celular. As células falciformes na impossibilidade de manter a homeostase catiónica variam quanto à sua densidade, concentração de hemoglobina média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e deformabilidade das células falciformes que se tornam irreversíveis ^(65, 187, 194).

Na Figura 1 pode observar-se, à esquerda o co-transporte de potássio e cloro (K-Cl), activado pela acidificação, tumefacção celular e hipóxia, e inibido pelos iões de magnésio (Mg^{++}). À direita, o canal de Gardos activado pelo influxo transitório de cálcio (Ca^{++}), devido à distorção da membrana pelos polímeros de HbS, e inibido pelo clotrimazol (Clo) ⁽⁴⁹²⁾. A importância da desidratação celular advém do seu reconhecimento como factor principal da concentração da HbS que, por sua vez, é o maior determinante da polimerização.

A polimerização da HbS e o *delay time* têm um papel crucial na fisiopatologia dos episódios vaso-oclusivos explicando a variabilidade do fenotipo ^(106, 338).

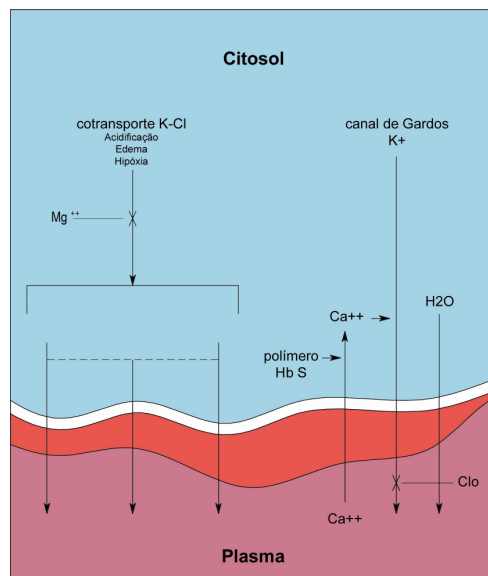


Figura 1. Principais mecanismos responsáveis pela perda de potássio e água nas células falciformes. Adaptada de Bunn ⁽⁶⁵⁾.

Mas esta noção simplista da falciformação não é a única responsável pela patogénese da doença; com efeito a vasculopatia falciforme inerente à variante homozigótica da HbS, torna-a impar entre as outras anemias hemolíticas. Trata-se dum mecanismo complexo e em investigação, responsável pelas complicações mais graves da doença.

Deve-se a Hebbel em 1991 a importância da vaso-oclusão, ao ter demonstrado que a adesão dos eritrócitos ao endotélio vascular se relaciona com as manifestações clínicas da vaso-oclusão, constatando que o grau de adesão se correlaciona com a gravidade clínica ^(119, 166, 167, 330, 486, 487).

Assim, surge na penúltima década um novo conceito: a interacção anormal entre o endotélio e os eritrócitos falciformes constitui um factor patogénico da vaso-oclusão. Os mecanismos moleculares que suportam a noção de adesão dos eritrócitos ao endotélio são complexos e envolvem muitas células e moléculas plasmáticas ^(217, 335).

Os eritrócitos falciformes devido à sua elevada carga em radicais de O₂ constituem, assim, um factor lesivo para o endotélio ao qual vão aderir, susceptível de alterar a sua integridade estrutural e funcional.

A interacção endotélio/eritrócito desencadeia a activação de elementos constituintes do sangue, tais como plaquetas ^(133, 304, 503), leucócitos ⁽⁴¹⁶⁾, monócitos ^(44, 429), reticulócitos ⁽¹⁴³⁾, a activação do complemento e da cascata da coagulação ^(133, 197, 327) e a libertação humoral e local de citocinas inflamatórias (IL8, IL1 e TNF α) ^(397, 437), bem como a formação de radicais livres de O₂ ^(65, 207).

A expressão das moléculas de adesão é mais importante ao nível dos reticulócitos e eritrócitos jovens a qual diminui à medida da maturação destas células.

A capacidade de os eritrócitos falciformes aderirem ao endotélio deve-se às suas propriedades reológicas e à riqueza de antigénios na superfície da membrana, tais como o complexo integrina $\alpha_4 \beta_1$ ⁽⁴³²⁾, glicoproteínas IV (CD36) e glicolipídios sulfatados que constituem pontos de adesão para as células e moléculas da matriz endotelial ⁽³⁹⁵⁾.

Os leucócitos contêm factores de adesão similares aos dos eritrócitos falciformes através dos quais aderem também ao endotélio vascular, deslocam-se para os tecidos e participam no processo da inflamação ⁽⁴¹⁴⁾.

As células endoteliais são o centro da patogénese da ACF ⁽⁴⁰³⁾. Elas contêm receptores para os eritrócitos, os CD36, moléculas de adesão das células vasculares (VCAM-1), e uma proteína, a endotelina-1 (ET-1), que uma vez activada é responsável pelas propriedades vasoconstritoras do endotélio. A VCAM-1 quando activada pelas citocinas inflamatórias, traduz a extensão da lesão e como tal pensa-se que seja um parâmetro de gravidade da doença ^(138, 189, 237, 395).

A reforçar o processo da vaso-oclusão, existem factores intermediários, como os multímeros do F. von Willebrand, a trombospondina, o fibrinogénio e a fibronectina que explicam parte da heterogeneidade da ACF ^(173, 184, 245, 300, 426).

Na vasculopatia, a hipóxia, componente fundamental da fisiopatologia na ACF leva à diminuição da produção do óxido nítrico (NO), o qual é importante regulador do tono vascular, da adesão celular e da formação de trombozes. Por estas acções, nos últimos dez anos, o NO tem sido de facto alvo de investigação como agente terapêutico na ACF ^(235, 396).

Em suma: - A HbS como um resultado da polimerização e dos seus efeitos oxidantes, lesa o eritrócito falciforme, provoca a inflamação e dá origem à lesão endotelial. Todos estes elementos são responsáveis pelo fenotipo da ACF.

- A adesão dos eritrócitos falciformes ao endotélio vascular aumenta o *delay time* dos eritrócitos através do sistema pós-capilar em hipoxémia, o que origina a polimerização e formação das células falciformes com subsequente vaso-oclusão⁽²³⁷⁾. Esta ligação do eritrócito ao endotélio leva, por sua vez, a aumento da viscosidade e a diminuição da velocidade do fluxo de sangue facilitando a oclusão dos vasos pelos eritrócitos falciformes.

Na Figura 2 observam-se as principais interacções entre os elementos do sangue e os receptores celulares e endoteliais. As VCMA-1 ligam-se ao complexo integrina $\alpha_4\beta_1$ dos eritrócitos e os CD36 do endotélio vascular, através da trombospondina, ligam-se aos CD36 e glicolípidos sulfatados dos eritrócitos falciformes⁽⁶⁵⁾.

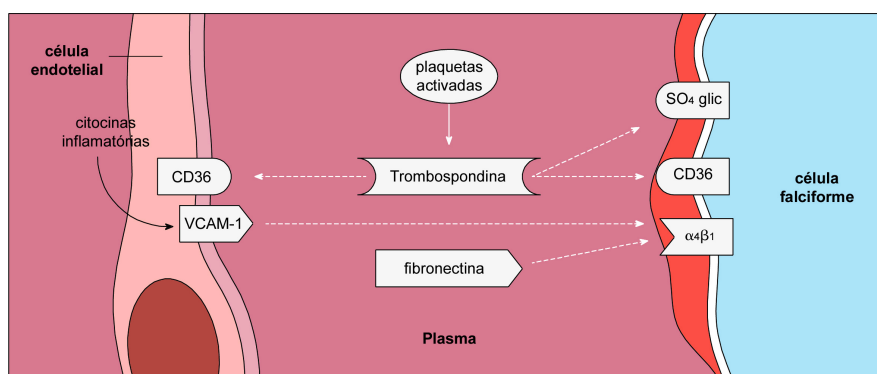


Figura 2. Principais interacções responsáveis pela adesão das células falciformes ao endotélio microvascular. Adaptada de Bunn⁽⁶⁵⁾.

Nesta síntese sobre a fisiopatologia, foram analisados vários parâmetros capazes de explicar a variabilidade da expressão clínica da ACF, sendo de igual modo importante uma breve referência aos aspectos genéticos.

Ao longo da história da humanidade houve em cinco situações temporais diferentes e locais distintos (quatro em África e uma na Ásia) a ocorrência de mutações que deram origem aos haplotipos que foram perpetuados até aos nossos dias através de transmissão à descendência.

São denominados de acordo com o local onde pela primeira vez foram descritos: Senegal, Benin, Bantu ou CAR e Camarões, constituindo este último um haplotipo “privado” do grupo étnico dos Etons, enquanto o haplotipo Asiático tem uma distribuição tribal ^(214, 222, 289, 313, 349).

Existe uma relação entre os três principais haplotipos, Senegal, Benin, Bantu e as características clínicas e hematológicas dos doentes com ACF ^(286, 344, 345, 347, 349, 364). Assim, o haplotipo Senegal associa-se a níveis mais elevados de HbF, maior prevalência de cadeias $\zeta\gamma$, baixa proporção de células densas e menor percentagem de células irreversíveis do que nos outros dois haplotipos Benin e Bantu ^(102, 155, 290).

Por sua vez os haplotipos também interferem na expressão clínica da ACF através do seu efeito modulador na concentração da HbF. Deste modo o haplotipo Senegal apresenta uma expressão clínica moderada relacionada com valores mais baixos de HbS inferior ou igual a 75% e mais elevados de HbF igual a 20% ^(286, 290, 345). Quanto ao haplotipo Bantu observa-se uma maior gravidade clínica dos doentes com valores de HbS superior ou igual a 80% e HbF inferior ou igual a 10%. O haplotipo Benin apresenta uma evolução clínica intermédia, entre o haplotipo Senegal (forma mais moderada) e o haplotipo Bantu (forma mais severa).

Actualmente investiga-se a possível influência dos haplotipos na interacção eritrócito/endotélio ^(348, 349).

A expressão clínica e hematológica da ACF é modificada pela co-hereditariedade dos genes α e β -globina. Sob o ponto de vista clínico a α -talassémia na $\beta^S\beta^S$ está relacionada com a persistência da esplenomegália e do hiperesplenismo, diminuição da síndrome tóraca aguda (STA) e da úlcera da perna, ainda que se verifique um aumento das complicações ósseas nomeadamente aumento do número de EVO e a necrose asséptica da cabeça do fémur ^(172, 391, 392).

Por sua vez, esta interacção tem repercussões hematológicas: diminuição da CHGM e do VGM. A redução da CHGM inibe a taxa de polimerização, diminui a falciformação e deste modo a taxa de hemólise do que resulta uma baixa da contagem dos reticulócitos e das células falciformes irreversíveis. Ao melhorarem as propriedades reológicas dos eritrócitos falciformes verifica-se uma melhoria da sobrevida dos doentes ⁽²⁵⁴⁾.

O efeito da α -talassémia na $\beta^S\beta^S$ constitui um modelo de grande interesse para a compreensão do papel dos grandes e pequenos vasos nas complicações da doença: assim devido à subida da Hb e ao aumento consequente da viscosidade do sangue há uma diminuição do fluxo nos grandes vasos. Por sua vez a diminuição da CHGM melhora o fluxo nos capilares por inibir a falciformação da HbS^(281, 419).

Os genes G_γ e A_γ estão ligados ao gene da β -globina e modulam a síntese da HbF, sabendo-se que valores elevados de HbF melhoram a evolução clínica por diminuição dos EVO^(26, 145, 221, 287). A HbF é de todos os moduladores da expressão clínica da ACF aquele que melhor se conhece.

Admite-se que polimorfismos ligados ao gene da β -globina podem influenciar a expressão do gene da γ -globina⁽²⁹²⁾ e que polimorfismos nucleótidos únicos em alguns genes possam vir a ser definidos como marcadores do fenótipo da ACF.

O conhecimento destes factores que influenciam a polimerização e a vasculopatia falciforme proporcionam linhas de orientação para o conhecimento de outros que estejam implicados na variabilidade clínica da doença e na concretização de terapêuticas específicas.

Fisiopatologia das complicações pulmonares

Os pulmões são particularmente vulneráveis à vaso-oclusão pelas células falciformes o que pode ser explicado pelas particularidades anatómicas que no seu conjunto a influenciam.

As alterações de crescimento observadas nos doentes com ACF afectam a forma e as dimensões do tórax^(401, 402, 450). Estas e a presença de cardiomegália, acontecimento frequente nesta patologia, constituem limitações aos volumes e movimentos do pulmão⁽³⁹⁴⁾.

Por sua vez os capilares alveolares diferem dos restantes por não apresentarem um trajecto linear. As arteríolas pré-capilares e as venulas pós-capilares localizam-se na intersecção dos alvéolos, estrutura que muda de tamanho e forma quando uma área do pulmão não é ventilada.

Os mecanismos patogénicos no pulmão devem-se às alterações das propriedades reológicas do sangue, à existência de um estado de hipercoagulabilidade, e acima de

tudo, à interacção entre as células falciformes e o endotélio dos vasos pulmonares, a que se associa uma perturbação da reactividade vascular na qual intervém o óxido nítrico (NO) ⁽¹⁶⁰⁾.

A estrutura quaternária da Hb é essencial para a sua função, captar o O₂ do pulmão e libertá-lo nos tecidos. A relação entre a pressão arterial de O₂ (PaO₂) e a saturação de O₂ no sangue arterial (SatO₂) é diferente na HbS ou na HbA ⁽⁶¹⁾.

A HbS tem menor afinidade para o O₂ devido ao seu elevador teor em 2,3-difosfoglicerato ⁽³³⁷⁾. A curva de dissociação da HbS é, assim, desviada para a direita, permitindo uma maior libertação de O₂ a nível tecidular. Por sua vez, a baixa de afinidade da HbS diminui a quantidade de O₂ nos alvéolos capilares.

Sabendo-se que a SatO₂ depende da função pulmonar e das características hematológicas inerentes à ACF, a sua determinação é importante para o tratamento das agudizações das complicações pulmonares e, na fase estável da doença, para detectar a hipoxémia crónica ^(116, 212). Os valores de SatO₂ avaliados pelo estudo dos gases no sangue arterial são sobreponíveis aos da oximetria de pulso, metodologia alternativa não invasiva cuja precisão é controversa ^(22, 55, 88, 130, 177, 314, 456).

A deformabilidade flutuante dos eritrócitos durante os “estados assintomáticos” aponta para que a descrição clínica de estado basal da doença seja um erro em termos reológicos. De um modo silencioso mas constante e progressivo, as células falciformes com maior produção de radicais de O₂ constituem um grande risco para a lesão parenquimatosa pulmonar.

As alterações respiratórias devem-se essencialmente a repetidas infecções e a episódios de oclusão na circulação pulmonar por falciformação *in situ*. Estas reforçam-se mutuamente na medida em que a hipóxia relativa de um pulmão infectado, aumenta, por sua vez, os riscos de falciformação e de trombose nas artérias pulmonares ⁽³⁹⁴⁾.

A microcirculação pulmonar é particularmente vulnerável a alterações na oxigenação, de tal modo que a infecção ou a hipoventilação de um segmento ou lobo pulmonar pode dar início a uma rápida e extensa hipoxémia. A circulação pulmonar responde à hipóxia com vasoconstrição enquanto que a circulação periférica responde com vasodilatação ^(92, 204, 394).

Apesar do pulmão proteger a HbS polimerizada durante a sua passagem na circulação arterial, o território vascular pulmonar com baixa tensão de oxigénio e baixa pressão num sistema de fluxo lento, é propício à falciformação da HbS e à lesão endotelial ⁽³³¹⁾.

O aumento do débito cardíaco e a diminuição das resistências vasculares periféricas relacionadas com a própria anemia crónica levam a uma diminuição do fluxo dos eritrócitos falciformes no sangue capilar. Tal facto facilita uma maior libertação de O₂ destes eritrócitos para os tecidos, de modo a manterem uma SatO₂ quase normal que permita uma oxigenação tecidular adequada ⁽⁴⁹⁰⁾.

A nível pulmonar, a sobrecarga circulatória conduz à alteração dos mecanismos de perfusão/ventilação, da difusão e das trocas dos gases com posterior hipoxémia. Numa fase inicial da lesão pulmonar a existência de uma expansão crónica do território capilar pulmonar constitui outro mecanismo compensatório ainda que temporário, para manter a capacidade de difusão da membrana alveolar (DL_{CO}) dentro dos valores normais ^(122, 165, 207, 343).

A DL_{CO}, frequentemente diminuída nos doentes com ACF, principalmente durante as complicações pulmonares, é compatível com a lesão da rede alvéolo-capilar, o tamanho do pulmão e com a circulação pulmonar a qual por sua vez, pode ser influenciada por níveis de Hb entre 6 e 8 g/dL ^(260, 394).

Aumentos posteriores do débito do ventrículo direito condicionam um aumento da pressão na artéria pulmonar. Esta situação agrava-se quando a capacidade de reserva do território vascular é comprometida pela vasculopatia ⁽⁴⁷²⁾.

A vasculopatia pulmonar ocorre geralmente durante a 2ª ou 3ª década de vida, como resultado de uma lesão crónica das pequenas artérias pulmonares com consequente hiperplasia endotelial e posterior vasoconstrição a que se associam o exsudado intra-alveolar com necrose da parede alveolar e o edema perivascular, que evoluem para uma fibrose pulmonar generalizada. Histologicamente nos estádios mais avançados observam-se sinais de uma doença arteriolar obliterativa disseminada e lesões fibróticas intersticiais não relacionadas com a formação de trombos nos vasos nem com doença embólica ⁽¹⁶⁵⁾.

A curto e/ou médio prazo e em relação com a evolução clínica, os doentes com ACF apresentam uma diminuição do crescimento toracopulmonar com deterioração

pulmonar que se traduz por alteração das provas da função pulmonar do tipo padrão restritivo com diminuição dos volumes pulmonares e da DLco ⁽¹²⁵⁾. Progressivamente instala-se um quadro de doença pulmonar restritiva incapacitante que, nas fases mais avançadas, dá origem a uma fibrose pulmonar grave e generalizada, na maior parte das vezes letal ⁽¹²²⁾.

A avaliação precoce da função cardiorespiratória por meio de estudos regulares com radiografia do tórax, avaliação da função pulmonar (AFP) com estudos dos gases no sangue arterial, tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) e ecocardiograma é tão importante como uma terapêutica dirigida e eficaz. Ambas podem alterar a história natural da ACF ^(47, 118, 341).

Fisiopatologia do sistema nervoso central

A vulnerabilidade do sistema nervoso central (SNC) não é surpreendente. A ACF é uma doença sistémica e os tecidos do SNC são muito sensíveis à hipóxia mesmo que temporária.

Tal como no pulmão também no cérebro, a hipoxémia é de extrema importância, uma vez que os mecanismos de auto-regulação do fluxo de sangue podem ser incapazes de compensar as deficiências crónicas na libertação de O₂ devido à própria anemia crónica e/ou a situações pulmonares agudas que a agravam, tornando-a determinante para a lesão cerebral.

Há um consenso geral segundo o qual a lesão cerebral se associa a vasculopatia falciforme, gerando-se a controvérsia entre: se a lesão cerebral se relaciona primariamente ao nível dos grandes vasos ^(56, 420), ou pelo contrário ao nível dos pequenos vasos ou ainda de ambos ⁽³²¹⁾.

Em 31% dos doentes com lesão cerebral, as grandes artérias são afectadas pela vasculopatia, enquanto os pequenos vasos estão comprometidos em mais de 69% dos doentes ⁽⁴¹⁰⁾. Este estudo veio dar um contributo decisivo na demonstração da noção já existente de que a ACF é uma doença dos grandes e dos pequenos vasos.

Segundo um estudo muito recente, a vasculopatia na maior parte dos doentes constitui um pródromo da lesão cerebral, muito provavelmente, pelas alterações

reológicas das células falciformes e pelo aumento da velocidade do sangue relacionada com a própria anemia.

Admite-se que a hemólise crónica que se mantém na fase estável da ACF, seja responsável pela libertação de moléculas tóxicas (heme e Hb livre) que estimulam uma maior produção pelas células endoteliais de VCAM, IL8 e TNF α determinantes do mecanismo de vaso-oclusão cerebral ⁽²⁰⁷⁾.

O mecanismo de adesão dos eritrócitos ao endotélio, como já referido, leva a alterações patológicas na função do endotélio e, conseqüentemente, a alterações das moléculas de vaso-regulação, incluindo a diminuição da síntese do NO.

A combinação do mecanismo de adesão com alterações na regulação do tono vascular precipita os acidentes vasculares cerebrais (AVC). Estes são devidos à estenose e oclusão *in situ* das grandes artérias cerebrais ou ao embolismo de trombos formados quer nos pontos de lesão vascular, quer nas áreas de maior turbulência criadas pela própria anemia ^(257, 322, 411).

Através da microscopia electrónica, observa-se nas grandes artérias a fragmentação e duplicação da lâmina elástica interna, com extensa hiperplasia da íntima, a qual por sua vez, invade o lúmen dos vasos e cria áreas irregulares de estreitamento endotelial, o que agrava a vaso-oclusão por promover a trombose.

Mecanismos de acção da hidroxiureia

A hidroxiureia (HU) foi sintetizada em 1869 por Dressler e Stein na Alemanha ⁽⁵⁰⁴⁾ e usada pela primeira vez no tratamento da leucemia mieloide crónica, em 1966. Desde então passou a ter indicação terapêutica nomeadamente em oncologia e na psoríase grave.

A observação dos efeitos secundários desta terapêutica (leucopénia, macrocitémia, anemia, com um perfil semelhante ao da anemia perniciosa) levou a formular-se a hipótese de que a HU podia inibir a síntese do ADN, o que foi confirmado mais tarde.

A HU é um inibidor específico de fase S da ribonucleótido redutase que actua na medula óssea e, através dos seus efeitos citotóxicos, selecciona uma população de eritroblastos que sintetizam quantidades elevadas de HbF ^(53, 371). Deste modo, inibe

selectivamente o ADN mas não interfere com a síntese do ARN nem de outras proteínas.

Sabendo-se que a HbF interfere com a polimerização da HbS devido à ausência de cadeias β na sua constituição, o aumento da produção da HbF diminui a gravidade da ACF^(66, 77, 104). As hemoglobinas A, A₂ e F influenciam o processo da falciformação não só porque reduzem a concentração da HbS intracelular, mas também porque híbridos da HbS com HbA₂ e HbF não entram na formação de polímeros^(75, 126). Esta última propriedade torna a HbF o inibidor mais potente da polimerização da desoxiHbS.

Outros possíveis mecanismos da HU estão relacionados com redução da eritropoiese e mielopoiese com diminuição do número de eritrócitos, reticulócitos, neutrófilos⁽⁵³⁾, monócitos e a redução dos receptores dos reticulócitos e dos eritrócitos – CD36 e do complexo integrina $\alpha_4\beta_1$ ⁽⁴²⁴⁾ com menor adesão destes ao endotélio vascular e portanto melhoria da função endotelial⁽¹⁶⁸⁾.

Como resultado da eficácia da HU verifica-se também uma redução da percentagem de células irreversíveis e das células hiperdensas, assim como da deformabilidade das células falciformes^(182, 453).

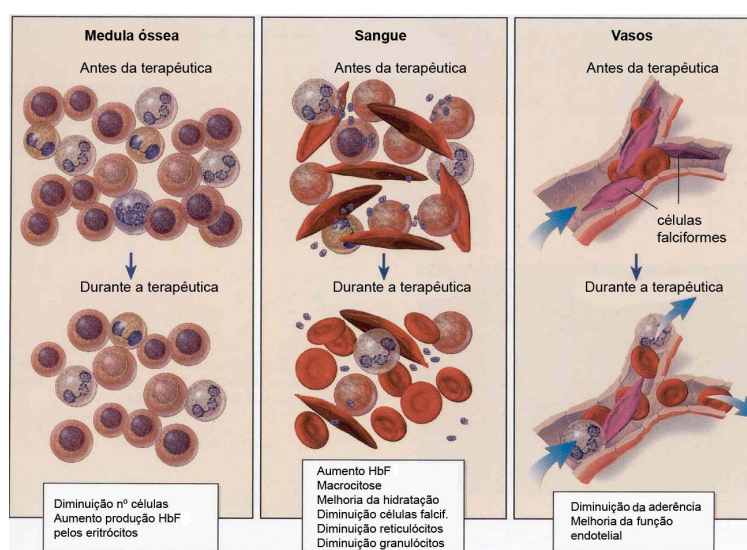


Figura 3. Mecanismos de acção da hidroxiureia. Adaptada de Steinberg, 1999⁽⁴¹⁵⁾.

Na Figura 3 observa-se comparativamente os mecanismos que ocorrem na medula óssea, no sangue e nos vasos sanguíneos, antes e após da terapêutica com HU.

A capacidade de resposta à HU depende da reserva da medula óssea, ou da capacidade da medula em resistir a doses moderadas da HU com uma mielotoxicidade aceitável ^(390, 413).

A eritropoietina por sua vez potência a eficácia da HU porque inibe a apoptose celular ^(35, 318).

Recentemente admite-se que o NO produzido pela oxidação do grupo heme da Hb pela HU activa a guanilciclase solúvel, aumentando a modulação genética da expressão do gene da γ -globina, e por consequência, a síntese de HbF ^(83, 149, 150, 200, 269, 428).

Numa base fisiopatológica, a investigação avança com outras terapêuticas para inibir a falciformação tais como: inibir a geleficação da HbS antes que ocorra a desoxigenação, modificar a membrana de modo a que fique menos apta à falciformação e melhore a perfusão periférica ^(51, 104, 105, 362, 467). De todas, a HU tem sido a terapêutica que se revelou até à data ser a mais eficaz e com menos efeitos tóxicos ^(94, 453, 508).

PRINCIPAIS COMPLICAÇÕES – ESTADO DA ARTE

As duas principais complicações da ACF a investigar, no âmbito desta dissertação, têm aspectos em comum.

Atingem órgãos nobres do organismo: o pulmão e o cérebro, cujas lesões têm repercussões a curto e longo prazo responsáveis por um tempo de sobrevivência mais curto e uma maior degradação da qualidade de vida de estes doentes, se estas complicações não forem diagnosticadas precocemente.

Ambas representam efectivamente manifestações precoces de lesão multi-orgânica. Têm início logo na primeira década de vida e constituem uma das principais causas de mortalidade de estes doentes até aos cinco anos de idade^(227, 333).

Enquanto no pulmão a falciformação se localiza na microcirculação e raramente envolve os grandes vasos pulmonares, no sistema nervoso central a falciformação situa-se também nos grandes vasos, nas artérias do polígono de Willis. Em ambos os órgãos a vasculopatia falciforme é constante e rapidamente progressiva.

A grande morbidade da ACF deve-se aos EVO mas, quando existe compromisso pulmonar, esta agrava-se. O pulmão, é um dos principais órgãos alvo da ACF. No decurso do processo patológico da falciformação surgem complicações, umas agudas e outras crónicas, as quais resultam em fibrose pulmonar. A fibrose pulmonar ao longo do tempo evolui para doença pulmonar crónica falciforme (DPCF) condicionando fortemente a vida dos doentes ⁽²⁰⁷⁾.

As manifestações torácicas agudas reflectem a existência de uma doença cardiorespiratória aguda a qual inclui a pneumonia, a STA e a insuficiência ventricular aguda; caracteristicamente traduz-se por cardiomegalia, derrame pleural, imagens de condensação na radiografia do tórax e opacidades em “vidro despolido” na tomografia pulmonar de alta resolução (TCAR) ^(381, 461).

As alterações crónicas incluem uma circulação hipercinética relacionada com a existência de uma anemia crónica e grave, tal como uma fibrose pulmonar progressiva que culmina na hipertensão arterial pulmonar ⁽⁴⁶⁸⁾.

O sistema cardiovascular, pela sua relação intrínseca, anatómica e funcional com o sistema respiratório, constitui “um todo”; deste modo, a obstrução do território vascular repercute-se no coração. Estas complicações presentes em 82,5% destes doentes ^(30, 37, 135), tem uma gama muito variada oscilando entre apenas verificação de um sopro de ejeção ou evidência de uma cardiomegalia, com ou sem alterações da função cardíaca e manifestações de insuficiência cardíaca letal.

Síndrome torácica aguda

A primeira definição da STA foi feita por Charache, em 1979, e outras se seguiram. Todas as definições são unânimes em caracterizar esta síndrome como uma complicação aguda e grave que requer uma terapêutica agressiva ⁽⁷³⁾.

É desde há muito reconhecido que a “pneumonia” em doentes com ACF, difere pela sua gravidade clínica da pneumonia na população em geral. Nas crianças com

ACF a pneumonia é cerca de cem vezes mais frequente do que na população pediátrica saudável, dada a sua maior susceptibilidade ⁽³⁹⁴⁾.

A escassez de dados comprovando a existência de uma causa infecciosa ou de um tromboembolismo, levou à designação de “síndrome torácica aguda” e à sugestão de que esta síndrome se deve a enfarte pulmonar ^(36, 72, 93).

Segundo os resultados do CSSCD e do JCS as STA constituem a primeira causa de morte em qualquer idade após os dois anos de vida e são, sem dúvida, a segunda complicação mais frequente, com 12,8% de ocorrências por 1000 doentes/ano ^(69, 207, 333, 464).

A incidência da STA é inversamente proporcional à idade: declina de uma incidência máxima de 25,8% na criança dos dois aos quatro anos até aos dez anos de idade, para 8,8% no adulto, sendo mais frequente na primeira década da vida ⁽⁶⁹⁾.

Apresentando maior frequência na idade pediátrica, é mais grave no adulto, para quem a taxa de mortalidade (4,3%) é superior em relação à das crianças (1,8%) ⁽⁹³⁾, apesar de 56% terem pelo menos um episódio de STA e 6% terem cinco ou mais episódios ⁽⁴⁶⁶⁾.

A expressão clínica da STA é muito variável. A gravidade difere entre as crianças e os adultos. Nos doentes com menos de quatro anos de idade a sintomatologia é escassa no início, o que dificulta o diagnóstico ⁽³³⁹⁾. Muitas vezes começa por febre não esclarecida, dor abdominal, torácica ou nos membros e em 35 a 40% dos casos a radiografia do tórax não revela alterações ^(229, 352, 404, 464).

Variações inter-individuais no curso clínico da doença estão ligadas a diferenças no haplotipo, verificando-se que os doentes com a variante Bantu têm maior incidência e gravidade da STA do que aqueles que têm o haplotipo Senegal.

Os níveis de HbF são inversamente proporcionais à STA e um aumento de HbF de 5 a 15% reduz a incidência da STA para metade, em todos os grupos etários ⁽⁴⁶⁴⁾.

No estado basal da doença, o aumento do número de leucócitos, da concentração da Hb e uma diminuição da concentração da percentagem da HbF são factores predisponentes para a STA ^(122, 148, 394).

A etiologia da STA é problemática e multifactorial, o que dificulta a optimização do tratamento.

Os resultados do CSSCD dos EUA e do CS da Jamaica demonstraram que a STA surge muitas vezes depois de um episódio vaso-oclusivo (principalmente quando este se localiza no tórax), numa situação de atelectasia secundária à dor por enfarte das costelas e vértebras ou após um acto cirúrgico ^(372, 404, 466); e enquanto causa primária de hospitalização surge apenas em 30 a 60% dos casos ⁽⁴⁰⁴⁾.

Os enfartes pulmonares têm várias etiologias, das quais a hipoventilação é a causa mais frequente pela sua relação com a hipoxémia, a que se segue a dor severa no tórax, o uso não controlado de opióides, as alterações do sono, e ainda que mais rara, a embolia gorda a partir de um enfarte ósseo ^(63, 123, 352, 374).

O papel da "espirometria incentiva", recentemente demonstrado por Bellet *et al.* ⁽⁴⁵⁾, diminui em muito as complicações relacionadas com a hipoventilação por hipoxémia.

Os enfartes quando localizados nas costelas são responsáveis pela dor torácica e por um processo inflamatório local tecidual com reacção pleural. A dor e a inflamação por si provocam hipoventilação alveolar, a qual, por sua vez, é uma das causas de atelectasia.

A embolia gorda e o trombembolismo pouco frequentes nas crianças, são também responsáveis pelo processo primário da lesão pulmonar nos adultos ^(199, 399, 471).

A importância das infecções bacterianas é atribuída à imunodeficiência característica destes doentes ^(273, 275, 507). Porém com o advento das medidas profilácticas e de melhores meios de diagnóstico, as infecções bacterianas têm sido documentadas em apenas 3,5% das STA, das quais 14% ocorridas em lactentes e 1,8% em crianças com mais de dez anos.

O isolamento do agente nem sempre é conseguido, não obstante, em 58% dos casos haver uma bacteriémia a *Sptreptococcus pneumoniae* e a *Haemophilus influenzae* 18% ⁽⁴⁶¹⁾. As infecções atípicas por *Mycoplasma* e *Chlamydia pneumoniae* são as mais frequentes e têm uma evolução particularmente grave nestes doentes ^(98, 107, 310, 464).

A etiologia vírica, comum nos doentes com menos de cinco anos, é responsável por 20% da etiopatogenia da STA. Tem uma distribuição sazonal e abrange uma grande variedade de vírus, tal como o vírus *Respiratório sincicial*, o *Parvovírus B19* e o *Citomegalovirus*, entre outros ^(110, 157, 236, 387).

Apesar da diversidade da etiopatogenia, na STA a sequestração pulmonar e/ou falciformação e consequente enfarte pulmonar são palavras-chave ^(18, 52).

Até há pouco tempo, a compreensão da síndrome torácica aguda (STA) e o desenvolvimento de um tratamento racional foram limitados pela existência de diferentes mecanismos patogénicos.

Recentemente, Marie Stuart e Yamaja Setty apresentaram elementos para a formulação de uma hipótese unificada da patogénese da STA, baseada no NO ^(101, 146, 147, 422, 427, 428). O efeito vasodilatador e citoprotector do NO contraria o processo induzido pelos efeitos da hipóxia pulmonar antes de ocorrer a lesão irreversível.

O NO actua também como regulador da adesão do eritrócito falciforme ao endotélio induzida pela hipóxia na microcirculação. Por esta razão, é considerado um potente factor de diminuição da adesão e importante para o tratamento da STA ^(21, 29, 235, 266).

Mas, tão importante quão a sua etiologia, é o conhecimento da extensão e recorrência da lesão pulmonar. É de referir que o risco de recorrência da STA é de 20 a 80%; e, que, em 16,9% das situações, uma história prévia de episódios repetidos da STA predispõe a doença pulmonar crónica falciforme (DPCF) ⁽³⁴³⁾.

Doença pulmonar crónica falciforme

O início deste processo surge nas primeiras duas décadas de vida e resulta de anos de falciformação sub-clínica e não controlada, a que se juntam outros factores, como as infecções e os enfartes, que agravam a lesão existente.

A DPCF ocorre mesmo na ausência da STA, o que não é surpreendente dada a vasculopatia crónica da ACF responsável por edema pulmonar e fibrose intersticial difusa e crónica com posterior hipoxémia ⁽³⁵⁴⁾. Estes factores explicam a frequência elevada de hipertensão pulmonar que se manifesta em fases mais tardias da doença associada a cor pulmonale. ^(277, 431).

Hoje sabe-se que a morte do Dr. Noel, primeiro doente em quem foi descrita a DPCF, registada como uma pneumonia, foi muito provavelmente devida a uma hipertensão pulmonar súbita e não detectada com cor pulmonale associado ⁽⁵⁰⁵⁾.

Sistema Nervoso Central

A ACF está associada a um elevado risco de lesão cerebral, a qual tem início na primeira década de vida, sendo a sua incidência 221 vezes superior à da população pediátrica em geral ⁽³⁰⁵⁾.

As manifestações neurológicas são comuns na DCF, mas são mais frequentes no fenotipo SS; entre estas mencionam-se as meningites, dada a maior susceptibilidade destes doentes às infecções, os AVC, os défices neuropsicológicos, as convulsões, as alterações da consciência e as alterações visuais e auditivas ^(258, 321, 393, 500).

A importância dos AVC na ACF deve-se a Sydentrichke *et al* que em 1923 descreveram pela primeira vez as complicações do SNC, embora o desconhecimento dos mecanismos envolvidos se tenha mantido até aos anos 60 ^(434, 435).

De todas as complicações, os AVC constituem a complicação mais devastadora e com maior mortalidade, com repercussão grave nas funções motoras e intelectuais. Daí a menor importância que se tem dado aos enfartes silenciosos (ES). No entanto, os ES são mais frequentes, sendo consensual a sua maior prevalência em relação aos AVC ^(202, 278).

Dados recentes indicam uma prevalência de 17% dos ES entre os seis e 16 anos de idade, enquanto os AVC ocorrem em 11% a 15% dos doentes com idade inferior a 20 anos ^(278, 305, 309, 325, 333).

A lesão cerebral, nomeadamente os ES podem, assim, existir em doentes sem manifestações neurológicas, nomeadamente história clínica de AVC, e serem detectados apenas através do estudo imagiológico, designadamente pela ressonância magnética nuclear crânio-encefálica (RMN-CE). Ainda hoje se questiona esta terminologia ⁽³²⁰⁾.

Com efeito, muitas destas lesões, apesar de serem clinicamente inaparentes, originam disfunções neuropsicológicas específicas e incapacitantes, com implicações profundas no sucesso escolar e nas actividades diárias dos doentes ^(99, 213, 257).

O facto de a prevalência dos ES não aumentar significativamente entre os seis e os 14 anos, implica que a lesão cerebral ocorra pelo menos antes dos seis anos de idade. Porém, o aumento do número médio de lesões com a idade e por doente indica a progressão da lesão cerebral ^(278, 320).

Deste modo, segundo alguns autores, os ES constituem um factor de risco para o desenvolvimento de futuros AVC e de novos e mais extensos ES ^(213, 264, 325). Mais de 30% destes doentes têm AVC, 75% dos quais são isquémicos devido à oclusão das artérias carótida interna e cerebral média, e 25% são hemorrágicos ⁽²⁷⁴⁾.

Segundo o CSSCD a prevalência total e a incidência dos AVC nos Estados Unidos da América nos doentes com ACF é de 4,96% e de 0,61% respectivamente. A incidência do primeiro AVC é mais elevada na primeira infância e apresenta dois picos, um entre os dois e cinco anos de idade (1,02%) e outro, entre os seis e os nove anos (0,79%). O risco de AVC diminui com a idade; a partir dos 10 anos a incidência decresce para 0,41% ^(11, 309).

Na grande maioria das vezes, os AVC constituem eventos isolados, ainda que possam surgir durante os EVO ou nas crises de anemia aguda. A manifestação mais comum é a hemiplegia de início súbito, seguindo-se, por ordem de frequência: as hemi ou monoparésias, as alterações da linguagem, as ataxias, as convulsões e o coma ^(33, 309, 310).

Os doentes com ACF têm frequentes e intensas cefaleias que podem ser consequência de hipóxia e/ou de vasodilatação cerebral.

Tanto os AVC como os ES estão associados a défices cognitivos significativos, os quais são mais graves nos AVC. De salientar que nem sempre se consegue uma recuperação total do estado neurológico e intelectual iniciais ^(27, 34, 88).

Cerca de 65% dos casos de AVC se não forem submetidos a tratamento, terão uma recorrência nos três anos seguintes ao episódio inaugural ^(278, 323, 474).

O CSSCD realizou o estudo "STOP – experiência para a prevenção do AVC em doentes de alto risco" o qual demonstrou que as transfusões regulares reduzem significativamente o risco de AVC em mais de 90% dos doentes ^(12, 244). Está ainda por definir, o tempo de duração da terapêutica ⁽³⁵⁵⁾.

A precocidade das lesões cerebrais e a grande frequência das sequelas neurológicas, legitimam o concluir que "a prevenção é mais importante do que o tratamento", dada a gravidade e a recorrência destas situações que além de frequentes são imprevisíveis.

A disponibilidade nas duas últimas décadas de novas tecnologias (menos invasivas do que aquelas que empregam radiações X) para a avaliação da lesão cerebral, tais como, a ressonância magnética nuclear-cranioencefálica (RMN-CE), ressonância magnética com sequência angiográfica (AngioRM), a ultrassonografia por Doppler transcraniano (DTC) e os testes psicológicos permitiram o estudo de novas áreas de investigação: a identificação precoce da criança em risco de ES e de AVC e a prevenção da recorrência dos AVC. Estes estudos têm um importante significado prognóstico assim como implicações terapêuticas.

INDICADORES DE PROGNÓSTICO

Têm sido descritos vários indicadores de prognóstico, (que alguns autores designam de factores de risco) pelo papel que desempenham na evolução e prognóstico da ACF, têm vindo a ser alvo de interesse para o estudo da variabilidade da sua expressão clínica.

A complexidade dos indicadores de prognóstico a nível individual e em particular quando agem em conjunto, torna difícil identificar o papel de cada um deles.

A expressão clínica da ACF é consequência de uma anemia hemolítica hereditária autossómica recessiva bem tolerada, com EVO dolorosos que, por dominarem a evolução da doença foram considerados um marcador clínico^(310, 332, 388). No entanto, nem todos os doentes sofrem de EVO com tradução clínica. A vaso-oclusão pode ser subclínica e pela sua repetição levar a lesão orgânica, a qual se vai agravando com o decorrer do tempo.

O quadro clínico é heterogéneo e apresenta um largo espectro de manifestações, desde formas letais ou profundamente invalidantes até formas clinicamente inaparentes ou de aparecimento tardio.

A heterogeneidade das manifestações deve-se a vários factores que, ao modular a fisiopatologia, contribuem para a elevada diversidade clínica. Destes destacam-se os genéticos, tais como o genotipo da DCF, os haplotipos da β -globina e a α -talassémia; e os não genéticos, tais como o fenotipo hematológico e clínico, e os factores sócio-económicos e ambientais.

Entre os primeiros, o genotipo da doença relaciona-se com o controlo quantitativo das próprias cadeias β^S e com os haplotipos que por sua vez modulam a expressão da HbF.

Além do gene β^S há a considerar “outros” genes também polimorfos, denominados pelos geneticistas de epistáticos, que podem participar na expressão fenotípica da doença. Entre estes, a α -talassémia deleccional e os determinantes de valores elevados da HbF podem ou não estar ligados aos haplotipos do agrupamento do gene β^S (292, 350).

A co-hereditariedade da α -talassémia associa-se a alterações hematológicas e clínicas específicas sendo, no entanto, controversa a sua influência na evolução da doença (268). A elevada prevalência de portadores da deleção da α -talassémia, 35% na África Equatorial e 50% na Arábia Saudita Oriental e Índia Central explica a frequente coincidência com a distribuição do gene β^S (392). Em Portugal foram encontradas as deleções 3.7 Kb ($-\alpha^{3.7}$) e a 4.2 Kb ($-\alpha^{4.2}$) com predomínio da primeira, numa prevalência da ordem de 10% (224).

No que respeita a factores não genéticos, a percentagem da HbF constitui o factor mais importante quanto à relação com a diversidade da história natural e a gravidade clínica da ACF. Os genes $G\gamma$ e $A\gamma$ são responsáveis pela síntese da HbF. Ainda que a relação apresente variações entre os doentes, valores mais elevados de HbF correspondem a evolução clínica mais favorável. No entanto, ainda é discutível qual o valor da HbF a atingir para se verificar uma melhoria do quadro clínico (31, 342, 383).

O nível de Hb no estado basal da doença varia entre os doentes e com as diferentes localizações geográficas. Valores elevados de hemoglobina total constituem um factor de risco para os EVO, as STA, a necrose asséptica da cabeça do fémur e para a retinopatia proliferativa falciforme. A sua relevância na morbilidade da doença faz com que seja considerada um elemento importante para a prática clínica.

Surgem novos conceitos, ainda em estudo mas que realçam o papel dos eritrócitos, dos leucócitos, do endotélio, das citocinas e da adesão de outras moléculas que actuam nas várias etapas da vaso-oclusão e que são considerados indicadores de prognóstico e de monitorização de novas terapêuticas (367, 378).

A estes principais indicadores associam-se os problemas psicossociais relacionados com uma vida de episódios dolorosos recorrentes e graves, de hospitalizações e de

tratamentos agressivos, que na maior parte das vezes são determinados pelo carácter crónico e debilitante da doença.

Em suma, enquanto o gene β^S é o resultado de uma única mutação genética, a ACF é o resultado de múltiplos factores; trata-se de um conceito que tem implicações diagnósticas e terapêuticas importantes. Deste modo, os doentes com ACF evidenciam grande diversidade de manifestações clínicas, apesar de serem portadores da mesma mutação génica.

Sendo grande a gama de factores implicados na variabilidade da ACF houve que seleccioná-los, embora todos parecessem igualmente importantes. O aparecimento de dificuldades de vária ordem foi limitando naturalmente o leque de opções.

A realidade de um grupo de crianças e adolescentes que precisava de crescer com uma melhor qualidade de vida e atingir a idade adulta com o menor número possível de estigmas de letalidade, tornou evidente o caminho a seguir e facilitou a selecção dos parâmetros a estudar.

FACTOR PROTECTOR DA ACF – HIDROXIUREIA

As hemoglobinopatias influenciam todos os aspectos da vida dos doentes, desde os familiares aos profissionais e até aos sociais.

A melhoria dos cuidados primários de saúde, a disponibilidade actual de um grande número de vacinas e de uma terapêutica profiláctica com ácido fólico e antibióticos, o rastreio neonatal e o diagnóstico precoce, melhoraram francamente não só a sua qualidade de vida, mas também aumentaram a taxa de sobrevivência.

A terapêutica transfusional com diversas indicações foi até há pouco tempo a única terapêutica eficaz para os doentes com ACF. Embora a mesma possa tratar e prevenir muitas das complicações, o seu uso indiscriminado constitui um risco para os doentes de que dela carecem, pelo que deve ser criterioso ^(400, 415, 459).

Os transplantes da medula ou do sangue do cordão são a única cura de que se dispõe actualmente. Contudo poucos doentes com ACF têm sido transplantados devido à variabilidade do quadro clínico, à limitação da elegibilidade dos doentes pelo estado avançado da doença com envolvimento da vasculopatia pulmonar e cerebral, à

dificuldade em obter doadores histocompatíveis e à taxa de mortalidade associada à própria técnica^(48, 196, 457, 473, 489).

A transferência génica de células estaminais, ainda em investigação, permite reconstituir a função das células hemáticas, revertendo completamente a alteração intrínseca do gene que sofreu a mutação^(193, 198, 205, 279). No entanto, quando o fenotipo clínico inclui complicações em órgãos nobres, estas não são reversíveis. Esta metodologia ainda confinada à investigação laboratorial será num futuro a curto/longo prazo a cura definitiva e uma esperança para médicos e doentes.

Porém, estas duas últimas terapêuticas são muito específicas e dispendiosas, às quais a maior parte dos doentes não tem acesso.

Em 1948 Janet Watson afirmou que a HbF inibia a falciformação dos eritrócitos após observar que nos lactentes com ACF raramente surgiam sinais e sintomas da doença até se verificar diminuição significativa do nível de HbF⁽⁴⁸⁵⁾.

A farmacoterapia actual tem-se concentrado no aumento da HbF a fim de prevenir os EVO e as STA repetitivas com consequente falência multi-orgânica, responsáveis pelas elevadas taxas de morbilidade e mortalidade^(270, 333). A HU é o primeiro fármaco entre outros, de acordo com investigações já realizadas, que tem demonstrado ser eficaz no aumento dos valores de HbF^(66, 188, 209, 306, 417).

O primeiro ensaio multicêntrico, aleatório, controlado em adultos foi publicado por Charache *et al* em 1995, e demonstra que nos doentes tratados com HU baixou a frequência anual de EVO, as STA tornaram-se menos frequentes e diminuiu a necessidade de transfusões de sangue⁽²⁶⁷⁾.

Contrastando com a grande quantidade de informação existente em relação ao uso da HU nos adultos e o pequeno número de estudos pediátricos, as crianças têm uma melhor resposta à terapêutica, ainda que em ambos seja evidente o seu benefício clínico e hematológico e a boa tolerância. No entanto a HU não impede a progressão da lesão orgânica uma vez esta estabelecida, nem é um substituto da terapêutica transfusional na prevenção da recorrência dos AVC, excepto em raras situações^(368, 482).

O primeiro estudo piloto pediátrico com a HU foi publicado em 1996⁽¹²⁷⁾, e desde então sucederam-se mais de uma dúzia de estudos feitos em crianças e adolescentes com ACF.

As duas maiores séries integram os estudos de Kinney et al em 1999 ⁽²⁰¹⁾ e de Ferster *et al.* em 2001 ⁽¹²⁸⁾, em que ambos os autores confirmaram o claro benefício da HU na redução do número e duração dos internamentos, paralelamente a subidas significativas dos níveis de HbF e Hb.

A HU é uma terapêutica já aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) nos adultos e está na fase I /II de estudo nos grupos pediátricos ⁽²⁰¹⁾. A eficácia clínica da HU comprovada pela redução de 40% na mortalidade é um incentivo para a sua administração em todos os doentes com DCF ⁽⁴¹⁷⁾.

Actualmente, o tratamento prolongado com HU nos doentes pediátricos ^(128, 269, 504, 508) é eficaz, com aparente segurança e uma boa relação custo/benefício, mas são necessárias experiências com grandes séries para se poder afirmar que não existe risco de malignidade.

A presente dissertação integra o primeiro estudo de investigação feito em Portugal com HU em crianças e adolescentes com ACF.

SEGUNDA PARTE

Investigação

INVESTIGAÇÃO

OBJECTIVOS.....	39
DOENTES E MÉTODOS.....	41
Tipo de estudo.....	41
Amostra populacional estudada	41
Elegibilidade dos doentes.....	41
Critérios de inclusão	42
Critérios de exclusão	42
Caracterização dos doentes na data de início do estudo	42
Avaliação clínica dos doentes durante o período de estudo.....	42
Consentimento esclarecido.....	43
Grupo de controlo.....	43
Variáveis estudadas.....	43
Exames de confirmação de diagnóstico.....	44
Estudo hematológico	45
Estudo bioquímico	45
Estudo molecular.....	46
Exames para exclusão do estado de portador	46
Avaliação complementar	47
ESTUDO 1	47
REPERCUSSÃO DA DOENÇA NO SISTEMA CARDIO-RESPIRATÓRIO	47
Avaliação funcional respiratória.....	48
Estudo dos gases no sangue arterial.....	50
Radiografia do tórax.....	51
Tomografia computadorizada de alta resolução.....	51
Electrocardiograma	52
Ecodoppler cardíaco.....	52
ESTUDO 2	53
REPERCUSSÃO DA DOENÇA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	53
Exame neurológico.....	53
Ressonância magnética nuclear crânio-encefálica	54
Ultrassonografia por doppler transcraniano	54
Testes psicológicos.....	55
ESTUDO 3	57
TERAPÊUTICA COM HIDROXIUREIA.....	57
Critérios de inclusão	57
Critérios de exclusão	57
Administração da hidroxiureia.....	57
Avaliação clínica e laboratorial	58
Definições.....	58
ANÁLISE ESTATÍSTICA	62

OBJECTIVOS

A evolução clínica dos doentes com homozigotia para o gene da HbS durante as duas primeiras décadas de vida é marcada pela repetição de episódios de doença aguda e de períodos intercríticos de bem-estar relativo, durante as duas primeiras décadas.

A polimerização da HbS na ACF condiciona uma ligação anormal do eritrócito ao endotélio, tão proeminente e patogenicamente importante que leva a uma oclusão microvascular irreversível.

Esta lesão estabelece-se anos antes de as manifestações clínicas se tornarem evidentes. O pulmão e o SNC são, não só os órgãos mais atingidos, mas também os que contribuem mais significativamente para a morbilidade e mortalidade na idade pediátrica.

A falência orgânica é progressiva e irreversível e a velocidade da progressão é controlada geneticamente desde o nascimento.

A instituição precoce de uma terapêutica capaz de impedir ou minorar o estabelecimento da lesão multi-orgânica é tão importante como o seu diagnóstico.

Foram objectivos da presente investigação:

- Caracterizar o fenotipo clínico e hematológico numa amostra de doentes pediátricos com anemia de células falciformes.
- Identificar as lesões ao nível dos sistemas cardiopulmonar e nervoso central, avaliando-se as respectivas repercussões.
- Avaliar a presença de indicadores de prognóstico entre as variáveis seleccionadas.
- Estudar a acção da hidroxiureia nos doentes com as formas mais graves da ACF.

DOENTES E MÉTODOS

Tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo e multi-institucional, constituído por crianças e adolescentes portadores de hemoglobinopatia falciforme na sua forma homozigótica ($\beta^S\beta^S$).

A elaboração do protocolo de investigação em seres humanos obteve aprovação da Comissão de Ética do Hospital de Dona Estefânia e o projecto desta dissertação foi aprovado pelo Conselho Científico da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

Amostra populacional estudada

Das crianças e adolescentes seguidos na Consulta de Imuno-Hematologia Pediátrica do Hospital de Dona Estefânia, em Lisboa, durante um período de três anos, de 1 de Fevereiro de 1998 a 31 de Março de 2001, foram identificadas as que eram portadoras de ACF, de acordo com critérios definidos.

Seleccionou-se uma amostra com 32 doentes, sendo 16 do sexo feminino e 16 do sexo masculino, com uma idade cronológica compreendida entre os sete e os 18 anos: um de origem caucasiana, natural de Alcácer do Sal, vinte e nove de origem africana – Cabo Verde, S. Tomé, Guiné, Angola, Moçambique e Zaire e dois de origem Afro-Asiática (mãe angolana e pai indiano) todos residentes em Portugal.

O limite da idade escolhido para o estudo baseou-se nos dados da literatura relativamente à maior prevalência das complicações.

Elegibilidade dos doentes

A selecção dos doentes foi feita com base nos exames clínicos prévios e em informações obtidas por consulta do processo clínico e entrevista com os progenitores ou seus representantes.

CrITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados os seguintes critérios:

- 1) Diagnóstico de Anemia de Células Falciformes;
- 2) Idade \geq sete e \leq 18 anos, em qualquer dos sexos;
- 3) Período estável da doença;
- 4) Residência em Portugal;

CrITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não foram admitidos doentes com traço falciforme nem outras variantes da DCF.

Foram detectadas anteriormente à data do início do estudo as situações de patologia pulmonar aguda e/ou cerebral que pudessem interferir com a avaliação exclusiva de complicações da ACF nestes órgãos.

Caracterização dos doentes na data de início do estudo

Tratando-se de uma doença genética de carácter hereditário que se manifesta precocemente, os doentes foram caracterizados na data de início do estudo, através de parâmetros genéticos, clínicos e laboratoriais que permitiram conhecer a sua história pregressa e avaliar posteriormente a sua evolução.

Para a avaliação hematológica foi calculada a média aritmética dos valores hematológicos registados nos processos clínicos, no período estável da doença, até à data de início do estudo.

Avaliação clínica dos doentes durante o período de estudo

A recolha dos dados foi feita por entrevista directa aos pais ou outros familiares e por análise exaustiva dos processos da Consulta de Imuno-Hematologia do Hospital de Dona Estefânia, incidindo designadamente sobre a doença actual, antecedentes pessoais e familiares.

A avaliação clínica foi sistematicamente realizada pela autora durante a fase estável da doença, de seis em seis meses, durante o período de três anos em que

decorreu o estudo. Foram registadas informações específicas da avaliação respiratória e neurológica, ou acontecimentos especiais relacionados com a ACF, conforme ficha protocolada para este fim e apresentada nos anexos (Anexo 1).

O desenho do estudo de investigação obedeceu ao protocolo usado pelo CSSCD⁽¹³⁹⁾.

Consentimento esclarecido

Após informação e esclarecimento detalhado acerca dos objectivos do estudo, das implicações que adviriam, para os doentes e seus familiares, das provas a realizar, foi solicitado e obtido o consentimento, por escrito, com a preocupação de que a mensagem transmitida tenha sido compreendida pelos pais ou seus representantes, de acordo com os requisitos das normas internacionais de investigação em seres humanos. De igual modo se procedeu para o grupo de controlo (GC) (Anexo 2).

Houve necessidade de um GC para o estudo da função pulmonar e para os testes neuropsicológicos.

Grupo de controlo

O GC foi constituído por uma amostra com o mesmo número de crianças saudáveis, da mesma origem geográfica, emparelhadas para a idade e sexo e escolhidas entre os familiares e amigos dos doentes.

O emparelhamento consistiu na atribuição de um controlo a cada caso e teve como objectivo eliminar comparações enviesadas entre os casos, tornando a estimativa de risco relativo, para um determinado grupo, mais precisa do que se obteria sem o controlo.

Variáveis estudadas

A escolha das variáveis a investigar, para definir indicadores de prognóstico, resultou de uma pesquisa bibliográfica exaustiva sobre factores de risco associados à doença e, mais especificamente, às complicações estudadas, associada ao que a

prática clínica ao longo dos anos nos ensinou, com a finalidade de se encontrarem marcadores de prognóstico importantes para este grupo de doentes.

As variáveis estudadas foram as seguintes:

Idade, sexo, origem geográfica, estrato sócio-económico segundo a escala de Graffar adaptada (Méndez-Castellano) ⁽²⁵⁶⁾, o genotipo (haplotipos e a α -talassémia) e o fenotipo clínico (EVO, STA) e hematológico (HbS, HbF, cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ e hemograma com reticulócitos e plaquetas).

Com o objectivo de facilitar a análise global e o tratamento estatístico agruparam-se as variáveis como se segue:

Idade: \geq sete e \leq 18 anos

Sexo: masculino e feminino

Origem geográfica: caucasiana, africana e asiática

Estrato sócio-económico: classes I, II-III e IV-V de Graffar

Haplotipo da β -globina: Senegal, Bantu e Benin

α -talassémia: com ou sem deleção

Hemograma incluindo contagem de reticulócitos e plaquetas

HbS e HbF e cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$

Nº de EVO: ≥ 3 /ano, <3 /ano

Nº de STA: ≥ 1 /ano, <1 /ano

A classificação dos EVO adaptada de El-Hazmi et al ⁽¹¹²⁾ resultou da média do somatório dos episódios ≥ 3 ou <3 /ano, assim como o número de STA em ≥ 1 ou <1 /ano.

A classificação dos haplotipos baseou-se nos critérios definidos por Nagel ^(289, 290).

Dada a importância dos factores genéticos na evolução da ACF, foi avaliada a sua relação com os factores mais relevantes na evolução da doença, a HbF e o número de EVO.

Exames de confirmação de diagnóstico

O diagnóstico de ACF fundamentou-se em critérios hematológicos, bioquímicos e moleculares.

Estudo hematológico

As amostras de sangue periférico foram colhidas durante o período estável da doença, sempre com um intervalo mínimo de três a quatro meses, desde a última transfusão de concentrado eritrocitário desleucocitado e, sempre que possível, na data das avaliações clínicas.

O hemograma com contagem de reticulócitos e plaquetas foi analisado num contador hematológico automático *Advia 120*[®] Bayer (Dublin, Irlanda), regularmente calibrado e com controlo de qualidade interno diário e externo – INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) e UK NEQAS (UK National External Quality Assessment Scheme).

O estudo microscópico da morfologia celular foi efectuado num esfregaço de sangue periférico.

Estudo bioquímico

– Técnicas de electroforese

A quantificação relativa da HbS foi feita por densitometria após separação electroforética em acetato celulose a pH alcalino (8,4-8,6) ⁽³²⁾ e posteriormente foram usadas em sequência de aparecimento de novas metodologias, a focagem isoeléctrica das hemoglobinas como um método qualitativo com maior resolução ⁽³⁸⁾ e a técnica de cromatografia em coluna por LPLC (*Light Performance Liquid Chromatography*) como método quantitativo ambas com maior sensibilidade e especificidade ⁽²²⁸⁾.

Para rastreio e confirmação da presença da HbS foi usado o teste de falciformação ou o teste da solubilidade.

A HbF foi quantificada pelo método da desnaturação alcalina de Betke e HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), metodologia mais recente ^(50, 228).

Para a quantificação da HbA₂ usou-se a cromatografia em microcoluna (Helena Biosciences). ⁽³⁵¹⁾

As cadeias ^Gγ e ^Aγ da HbF foram determinadas por RP-HPLC (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography). Utilizou-se uma coluna Lichospher 100 RP8 (Merck) e uma mistura de quatro eluentes (acetonitrilo, metanol, NaCl 0,155M, pH

2,7 e OH₂ desionizada). A separação foi efectuada num cromatógrafo (Gold Beckman), em gradiente durante 75 minutos, com um fluxo 0,7 mL/minuto ⁽²²⁸⁾.

As cadeias de globina são detectadas a 215mm num detector espectrofotométrico de U.V. (ultravioleta) ⁽²²⁸⁾.

Estudo molecular

O ADN genómico total foi extraído usando o método de *salting-out* simples seguido por uma extracção fenol-clorofórmio ⁽²⁶¹⁾.

A mutação drepanocítica no locus H $\beta\beta$ foi confirmada em cada caso pela restrição com a endonuclease MstII de um fragmento de ADN amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) correspondente à região 5' do gene da β -globina ⁽³⁷³⁾.

A identificação dos haplotipos no agrupamento génico da β -globina nos 34 cromossomas portadores da mutação drepanocítica foi realizada pela amplificação de fragmentos de ADN que englobam sítios de restrição polimórficos seguida de retrição com as endonucleases apropriadas - RFLP clássico (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) ⁽²²⁴⁾.

A determinação da deleção da α -talassémia foi efectuada pela metodologia de PCR, utilizando "primers" específicos ^(103, 40). Foram pesquisadas as deleções mais frequentes na população portuguesa - α ^{3.7} e - α ^{4.2}.

Exames para exclusão do estado de portador

Para excluir no GC seleccionado o estado de portador foram feitos os seguintes exames:

- Hemograma com contagem de reticulócitos e plaquetas, e estudo morfológico do sangue periférico;
- Teste de falciformação com um agente redutor (ditionito de sódio);
- Quantificação da HbS pela técnica de eletroforese a pH alcalino (8,4-8,6) e posteriormente por LPLC.

Avaliação complementar

Os estudos bioquímicos no sangue periférico foram realizados no autoanalisador Synchron CX 9 Beckman (USA), sendo efectuado controlo de qualidade dos vários parâmetros analíticos em todas as séries efectuadas, com utilização de soros de controlo de teor normal e patológico. Efectuaram-se os programas de avaliação externa de qualidade RIQAS (UK Radam Internal Quality Assessment Schema) e EQAS (UK External Quality Assessment Schema).

A função renal foi avaliada através de técnicas padronizadas de doseamento da ureia, pelo método urease UV (ultravioleta) e da creatinina, utilizando o método Jaffé modificado.

Procedeu-se à avaliação da citólise e da função hepática pela determinação da actividade enzimática de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama glutamiltranspeptidase e fosfatase alcalina.

O tempo de protrombina foi determinado pelo método de Quick num coagulómetro automático BCS (Marburg, Alemanha).

O doseamento da bilirrubina directa e total foi feito pelo método de Diazo reacção.

A ferritina foi determinada pelo método de quimioluminiscência - Immulyte 2000. Diagnosis Product Cooperation (Los Angeles, EUA).

ESTUDO 1

Repercussão da doença no sistema cardio-respiratório

A existência da lesão pulmonar fez-se através da avaliação funcional respiratória (AFR) e do estudo dos gases no sangue arterial, no Laboratório de Exploração Funcional Respiratória do Hospital de Dona Estefânia, de exames imagiológicos, nomeadamente radiografia do tórax, tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR), realizados no Serviço de Imagiologia do mesmo Hospital e de electrocardiograma (ECG) e ecocardiograma (EcoCG), efectuados no Serviço de Cardiologia Pediátrica do Hospital de Santa Marta.

A avaliação do sistema cardiorespiratório repetiu-se ao fim de dois anos para todas as provas, com um intervalo de 1 a 12 meses entre a AFR e a TCAR.

– Critérios de inclusão

Aos critérios de inclusão pré-definidos para o desenho do estudo, acrescentou-se nesta avaliação, a necessidade de seis semanas de intervalo entre a realização da AFR e uma infecção respiratória aguda pulmonar, EVO ou transfusão de sangue. Tratando-se de uma infecção das vias respiratórias superiores foi considerado o intervalo mínimo de duas semanas.

– Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo, todos os doentes que não cumpriam os critérios de inclusão ou que não aceitaram participar na AFR, o que aconteceu apenas no GC.

– Grupo de controlo

A escolha de um GC em criança saudável para a avaliação da função pulmonar (AFP), emparelhado para a idade, sexo e origem geográfica, deve-se ao facto de os volumes pulmonares serem influenciados pela forma e tamanho do tórax, tendo em conta as alterações do desenvolvimento estaturo-ponderal destes doentes, e pelas propriedades físico-químicas da HbS. Deste modo a interpretação da AFR depende de um GC adequado ^(317, 479).

Avaliação funcional respiratória

Para avaliar a presença e natureza da disfunção pulmonar da amostra populacional em estudo, aplicaram-se três métodos diferentes: espirometria/ /pneumotacografia para a medição do volume expiratório forçado em um segundo (FEV_1) e da capacidade vital forçada (FVC), o método de diluição do hélio (He) em circuito fechado para a medição da TLC, e a capacidade de difusão alvéolo capilar pelo monóxido de carbono por respiração única (DLco SB) ⁽⁹⁰⁾.

Os parâmetros citados TLC, o FEV_1 , a razão FEV_1 / FVC e a DLco são considerados suficientes para a AFR na ACF ^(90, 280).

A metodologia utilizada nas três provas seguiu as normas da *American Thoracic Society* (ATS, 1995) ⁽³⁰³⁾. Os valores das provas foram expressos em percentagens do

valor previsto, de acordo com os critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade também da ATS ⁽¹⁶¹⁾. O resultado da DLco em valor absoluto foi também registado em percentagem do valor previsto, depois de padronizado em função do volume alveolar de acordo com as normas da ATS ⁽³⁰³⁾.

Espirometria/pneumotacografia

Utilizou-se um pneumotacógrafo tipo *Lilly* de marca *Jaeger* (Wurzburg, Alemanha) computadorizado, para medir os volumes e os débitos pulmonares, sendo os exames sempre feitos pela mesma técnica especializada (A.M.). O pneumotacógrafo foi calibrado diariamente e sujeito a um programa de controlo de qualidade.

Antes da sua execução foi necessário proceder à recolha de parâmetros com influência nos valores previstos para a função pulmonar, tais como a altura medida com uma craveira da marca *Seca*, o peso medido numa escala de uma balança da mesma marca, e a idade avaliada pelo número de anos à data da realização da prova.

No decurso da prova, o doente está sentado de forma correcta, com a cabeça elevada usando uma mola no nariz e a respirar através de uma peça bucal descartável para o pneumotacógrafo, em ambiente tranquilo e num espaço adequado.

Dada a necessidade de um repouso de cerca de cinco minutos antes da prova, tenta-se obter a colaboração do doente, explicando o procedimento do exame com ênfase na necessidade de ter de ser feita uma inspiração máxima seguida de uma expiração rápida e sustentada até à interrupção do exame.

O número mínimo de curvas aceitáveis deve ser três, com duas reprodutíveis, e nunca mais de oito. A duração do tempo expiratório deve ser seis segundos, mas nas crianças e nos adolescentes, o esvaziamento completo pode ser excessivamente rápido e obterem-se tempos inferiores a seis segundos.

Todo o procedimento descrito seguiu as normas da ATS, 1994 ⁽⁹¹⁾.

Capacidade de Difusão em respiração única

Utilizou-se a capacidade de difusão alvéolo capilar do monóxido de carbono por respiração única (DLco) em conjunto com a TLC_{He} usando o hélio como um gás inerte.

No método de respiração única, ou *Single Breath* ⁽⁹⁰⁾, o doente respira uma mistura gasosa de CO (0,3%), hélio (10%) e ar. No final da inspiração máxima não forçada inferior a 2,5 segundos deve manter-se uma apneia inspiratória durante 10 segundos, neste período, o CO difunde para os capilares pulmonares. Quanto maior for a capacidade de difusão, maior quantidade de CO passará para o sangue.

Nesta técnica de respiração única, é necessário determinar os seguintes parâmetros:

O CO captado, em mL/min, que se calcula a partir da diferença entre a concentração de CO no início e no fim da fase de apneia, multiplicando o valor obtido pela ventilação alveolar calculada a partir da capacidade residual funcional (FRC);

A pressão média de CO no capilar pulmonar (desprezível);

A pressão média de CO nos alvéolos

Esta última permanece constante nos 10 segundos de apneia decrescendo continuamente à medida que uma parte do CO vai difundindo para o sangue. Por isso a $P_A\text{CO}$ não é igual à média aritmética da $P_A\text{Co}$ inicial e final.

O método da apneia inspiratória é bastante específico, pois não sofre influência das alterações do ritmo respiratório, tem também a vantagem, de ser repetido a intervalos curtos, mas o inconveniente de ser de difícil execução para os doentes com dificuldade em suspender a respiração.

Estudo dos gases no sangue arterial

A determinação dos gases no sangue arterial, pela técnica da espectrofotometria por infravermelhos, foi feita com um analisador *Radiometer ABS System 625* (Copenhague) da série *Acid-Base Laboratories* (ABL). As calibrações automáticas feitas diariamente, a intervalos seleccionados, são independentes do programa de controlo de qualidade.

A colheita da amostra de sangue da artéria radial foi precedida duas horas antes pela colocação de um penso Emla[®] (25mg de lidocaína e 25mg de prilocaína) no local da punção. Para tal, usou-se uma seringa heparinizada e a amostra de sangue arterial (250 µL) foi lida de imediato.

Dos parâmetros medidos, registaram-se apenas o PaO_2 e SatO_2 como indicadores da captação de O_2 pulmonar, uma vez que o estudo decorreu na fase estável da doença.

Radiografia do tórax

As radiografias do tórax em incidências postero-anteriores e perfil esquerdo, segundo a metodologia convencional, precederam a tomografia axial computadorizada pulmonar de alta resolução.

Tomografia computadorizada de alta resolução

O equipamento de tomografia computadorizada utilizado é da marca *Siemens* modelo *Somatom plus 4* (sub-segundo) *lightning UFC* com detectores cerâmicos (Washington, USA).

Todos os cortes foram feitos em decúbito dorsal e, sempre que se conseguiu a colaboração do doente, obtiveram-se em apneia inspiratória.

Fizeram-se seis cortes, com uma espessura de 1 mm, nos seguintes níveis: crossa aórtica (dois espaçados de 10 mm), carina (dois espaçados de 10 mm), e lobos inferiores (dois espaçados de 10 mm). O tempo do corte foi de 0,75 segundos, com uma quilovoltagem de 140 KV e 70 a 118 mAS, sendo o registo fotográfico com largura da janela de 1200 HU e nível de -600 HU (Unidades Hounsfield).

Os seis cortes realizados permitiram avaliação satisfatória pulmonar com visualização mesmo que parcial de todos os lobos pulmonares. Obteve-se a menor radiação possível para os objectivos do estudo tendo em atenção o grupo etário numa fase estável da doença.

Os exames foram lidos de forma independente por dois radiologistas, (E.T.S., F.A.) que não conheciam a história clínica dos doentes nem os dados da radiografia do tórax. Confrontaram-se as respectivas interpretações, não se tendo verificado dissonância nos resultados de leitura.

Electrocardiograma

Usou-se o electrocardiograma de superfície de 15 derivações convencionais (doze clássicas, e VE, V3R, V4R).

A hipertrofia ventricular esquerda foi definida pela verificação de um índice de Heller-Blondeau-Lenégre (SV2 + RV6) superior a 40 mm ou uma onda R superior a 25 mm em V5 ou V6 com um desvio do eixo esquerdo de QRS e/ou um índice de Lewis igual ou superior a 17.

Os critérios para a definição de hipertrofia ventricular direita foram o R/S superior a 1 em V1, com um desvio axial direito e/ou um índice de Lewis menor que menos 14.

Ecodoppler cardíaco

Procedeu-se a ecocardiograma completo com estudo em modo M, bidimensional e Doppler codificado em cor, pulsado e contínuo, realizados num ecógrafo Vingmed system five (Matto Ishikewa, Japão) com sonda 3,5 MHz sempre pelo mesmo cardiologista pediátrico (G. N.).

Para estudo da função cardíaca esquerda foram analisados os seguintes parâmetros: dimensões da aurícula esquerda (AE), ventrículo esquerdo (VE), estudo da função sistólica calculada pela fracção de encurtamento do VE (dimensão do VE, parede posterior do VE e septo interventricular em sístole e em diástole), estudo da função diastólica do VE.

Para estudo da função cardíaca direita avaliou-se: dimensão do ventrículo direito (VD), tempo de aceleração do fluxo sistólico na artéria pulmonar (três medições por doente), tempo de ejeção do ventrículo direito (três medições por doente), cálculo da pressão no ventrículo direito a partir do estudo da regurgitação tricúspide por Doppler contínuo.

Para determinar as dimensões das cavidades cardíacas usaram-se os valores de referência que são adoptados no serviço de Cardiologia Pediátrica do Hospital de Santa Marta. Considerou-se que o ventrículo esquerdo é hipercinético quando a percentagem de encurtamento é superior a 42% e hipocinético quando aquela é inferior a 24% ⁽³⁷⁷⁾.

ESTUDO 2

Repercussão da doença no sistema nervoso central

Com a finalidade de avaliar o impacto da ACF no sistema nervoso central, foi feito um estudo prospectivo com a duração de dois anos que incluiu exame neurológico convencional, ressonância magnética nuclear crânio encefálica, ultrasonografia Doppler transcraniana e testes psicológicos.

Os doentes elegíveis neste estudo além de cumprirem critérios pré-definidos foram considerados os seguintes **critérios de inclusão**:

- 1) Período peri-natal sem antecedentes de complicações nem de lesões traumáticas.
- 2) Ausência de antecedentes de outra doença crónica.
- 3) Ausência de antecedentes de complicações neurológicas tais como hemiplegia, convulsões, atrasos mentais, perdas da acuidade visual e infecções do sistema nervoso central.

Exame neurológico

Todos os doentes deste estudo foram submetidos a um exame neurológico convencional, realizado sempre pelo mesmo Neurologista Pediátrico (E.C.).

A avaliação neurológica de cada doente incluiu: determinação do estado de consciência e funções cognitivas superiores (atenção e concentração, memória, raciocínio lógico) e ainda a avaliação dos campos visuais, pares cranianos, tônus e força muscular, reflexos osteotendinosos e cutâneo-plantares, sensibilidades, provas de coordenação, marcha e estação de pé, e sinais meníngeos.

A descrição do exame obedeceu a um procedimento uniforme em todos os doentes, de acordo com as normas de investigação clínica do Serviço de Neurologia Pediátrica do Hospital de Dona Estefânia.

A avaliação do GC só se efectuou quando a informação veiculada pelos pais era sugestiva de patologia neurológica.

Ressonância magnética nuclear crânio-encefálica

Para o estudo imagiológico por Ressonância Magnética Nuclear Crânio-Encefálica (RMN-CE) utilizou-se o equipamento 1.0T General Electric Horizont 8.4 e o 1.5 T General Electric Sigma 8.3, CVI 8.4 M3 (U.S.A.). Os critérios de aceitação das imagens foram estabelecidos por dois neuroradiologistas (J.D. e E.M.).

As sequências e planos obtidos segundo linha bicomissural, comuns a todos os doentes, foram a sagital T₁ 5mm SE, a axial T₂ 5mm FSE e a axial T₂ fast flair 5 mm. As sequências complementares, quando necessárias em alguns doentes foram a coronal T₂ FS, coronal T₂ fast flair, angio RM-3D PC cerebral, ponderação em difusão e axiais DP.

Todos os exames de RMN-CE foram revistos centralmente e nunca foi usado meio de contraste.

Os mesmos neuroradiologistas fizeram a leitura dos exames independentemente e registaram as suas interpretações de uma forma convencional. Eles desconheciam a história clínica, os valores laboratoriais, os resultados dos testes psicológicos ou do Doppler Transcraniano (DTC).

Áreas de mielinização tardia na substância branca periarterial, substância cinzenta heterotópica focal e sulcos profundos não habituais, não foram classificados como lesões de enfarte/isquémia.

Foram especificados os sinais de lesão dentro do cerebelo, hemisfério, lobos e localização dentro da substância branca profunda, do córtex ou de ambos. Não foram registadas a localização anatômica das lesões de enfarte no cerebelo, gânglios basais, tálamo e tronco cerebral. As lesões foram classificadas de acordo com as dimensões, em pequenas (inferiores a 0.5 cm), médias (0.5 a 1.5 cm) e grandes (superiores a 1.5 cm) ⁽²⁷⁸⁾.

Ultrassonografia por doppler transcraniano

O estudo ultrassonográfico das artérias intracranianas realizado sempre pelo mesmo observador, com grande experiência em ultrassonografia cervico-encefálica (J. R.), foi efectuado com um aparelho DTC TC2-64, da EME (*Überlingen*, Alemanha) com

o doente vígil, em condições de repouso e em decúbito dorsal. A sensibilidade e especificidade do Doppler estão padronizadas ⁽⁷⁾.

Utilizou-se uma sonda de 2MHz e a penetração óssea dos ultra-sons fez-se através da janela temporal. No polígono de Willis foram estudadas as artérias cerebrais anteriores (ACA) e média (ACM) e a extremidade proximal da carótida interna.

A identificação da ACM foi realizada a uma profundidade de 40 a 60 mm, com o sentido do fluxo dirigido para a sonda. Com sentido divergente à sonda, e a uma profundidade de 50 a 65 mm, identifica-se a ACA. Foram determinadas as velocidades máximas e média nos vasos estudados, tendo-se considerado apenas os registos correspondentes aos valores mais elevados.

Adoptaram-se os critérios de Adams para considerar um estudo como positivo: um ou mais dos seguintes parâmetros presentes ⁽⁵⁾.

- 1) Velocidade média de 190 cm/segundo ou superior em qualquer das artérias;
- 2) Velocidade do fluxo anormalmente baixa na ACM ou fluxo de baixa velocidade, que ocorre quando velocidade máxima é menor que 70 cm/segundo e a razão da ACM (valor mais baixo/valor mais elevado) é igual ou inferior a 0,5;
- 3) Razão entre ACA e ACM maior ou igual a 1,2 do mesmo lado;
- 4) Impossibilidade de registo da ACM na presença de uma janela ultrassónica.

Os resultados do DTC foram classificados em normais, condicionais e alterados de acordo com a velocidade do fluxo de sangue. Assim se as velocidades são inferiores a 170 cm/segundo os resultados são normais, se superiores a 170 ou inferiores a 200 cm/segundo são condicionais. Velocidades iguais ou superiores a 200 cm/segundo são consideradas alteradas e os doentes estão em risco de AVC ⁽¹⁰⁾.

Testes psicológicos

Os testes psicológicos realizados a todos os doentes do estudo e a todos os indivíduos do grupo de controlo para avaliar o neurodesenvolvimento foram efectuados por uma psicóloga clínica (L.C.), que desconhecia o fenotipo clínico e hematológico dos doentes e utilizou um conjunto de quatro testes.

A idade escolhida como critério de exclusão, baseou-se na intenção de todo o grupo executar os mesmos testes psicológicos, nomeadamente: escalas de

inteligência de Wechsler, matrizes progressivas de Raven, teste de Toulouse-Piéron e teste gestáltico visuomotor de Bender.

A escolha dos testes remeteu para a avaliação da atenção e função executiva que segundo DeBaun *et al* ⁽⁹⁹⁾, são os domínios que apresentam maior sensibilidade para os enfartes silenciosos.

- Escalas de Inteligência de Wechsler (WISC-R e WAIS), o primeiro para crianças e adolescentes até aos 16 anos e Wais para idades superiores e adultos. O desempenho foi avaliado em termos de QI da Escala Completa e permite determinar o nível das aquisições escolares e caracterizar intelectualmente a amostra (Marques, 1970).

- Matrizes Progressivas de Raven, adultos e colorida (MPR e MPR-C), que consistem num conjunto de escalas de avaliação da inteligência geral, mais propriamente da capacidade de raciocínio lógico-abstracto, não dependente de factores culturais nem diferenciando doentes de meios sócio-económicos diferentes (Raven, 1950).

- Teste de Toulouse-Piéron (TP) usada para avaliar a atenção concentrada, através de uma tarefa rotineira que exige concentração e resistência à monotonia (Toulouse *et al.*, 1986).

- Teste Gestáltico Visuomotor de Bender permite avaliar a maturação visuo-perceptiva e visuo-construtiva que caracteriza o desenvolvimento intelectual de acordo com o desenvolvimento neurológico (Clawson, 1980).

Todos os doentes e controlos foram avaliados durante um período compreendido entre duas a quatro horas, consoante a sua idade e o êxito da execução.

Antes da execução dos testes foi elaborada uma história para avaliar possível psicopatologia, a fluência discursiva, a sociabilidade e a motivação para a tarefa.

As informações quanto ao nível de escolaridade e o meio socio-económico de todos os doentes e controlos foram avaliadas na entrevista com os pais ou encarregados de educação.

ESTUDO 3

Terapêutica com hidroxiureia

No âmbito desta investigação realizou-se um estudo aberto, prospectivo, não controlado, de administração da HU num grupo de crianças e adolescentes com as formas mais graves da doença.

Critérios de inclusão

Foram incluídos para o estudo um grupo de nove doentes seguidos na Consulta de Imuno-Hematologia do Hospital de Dona Estefânia com idade igual ou superior a oito anos com as formas mais graves de ACF (número de EVO \geq 3/ano ou de STA \geq 1/ano, AVC ou síndrome de disfunção multi-orgânica).

Os EVO referidos foram os que levaram a internamento, assim como os STA foram os que tiveram necessidade de transfusões por diminuição SatO₂, ou descida dos valores da hemoglobina dois desvios padrões.

Dos doentes seleccionados dois estavam em regime transfusional regular (RTR), um porque teve um AVC e outro por Síndrome de disfunção multi-orgânica (SDMO).

Critérios de exclusão

Constituíram critérios de exclusão as alterações da função hepática ou renal, gravidez em curso ou recusa na utilização de preservativos e não adesão ao protocolo terapêutico.

Administração da hidroxiureia

Antes da administração de HU, os doentes foram submetidos a exames complementares de diagnóstico que incluíram hemograma, HbF, bilirrubina total e directa (BT e BD), desidrogenase láctica (LDH), transaminase glutâmica oxalacética (GOT), transaminase glutâmica piruvica (GPT), tempo de protrombina (PT), ureia (U) e creatinina séricas (C), PCR e análise sumária de urina (U).

Como não existe formulação pediátrica de HU disponível em Portugal, apenas cápsulas de 500 mg, a dose semanal total que corresponde à dose determinada em função do peso em Kg/dia, foi dividida de modo a que criança tomasse **n** cápsulas um dia e **n+1** cápsulas no dia seguinte. Este facto foi factor determinante para a escolha do grupo etário nesta amostra.

A HU foi administrada na dose inicial de 15 mg/kg/dia, em toma única oral. Na ausência de toxicidade, esta dose foi aumentada 5 mg/kg/dia, oito a doze semanas até à dose de máxima de 25 mg/kg/dia. Adicionalmente, os doentes receberam ácido fólico 2,5 mg/dia per os.

No caso de mielotoxicidade, a dose seria reduzida 2,5 a 5 mg/Kg/dia e no caso de toxicidade renal ou hepática, a administração de HU seria suspensa até normalização dos parâmetros.

Avaliação clínica e laboratorial

Os doentes foram avaliados clínica e laboratorialmente, com intervalos quinzenais e mensais até estabilização da dose e depois trimestrais.

A avaliação clínica incluiu inquirição sobre o número e tipo de complicação (EVO, STA, AVC ou SDMO), número e duração dos internamentos, número de transfusões sanguíneas e existência de efeitos de toxicidade.

Os parâmetros clínicos foram analisados e comparados segundo a duração do período de seguimento dos doentes.

Os parâmetros laboratoriais dos doentes com internamentos programados e em regime transfusional, nomeadamente aqueles com AVC e SDMO, foram retirados da análise estatística por constituírem factores de enviesamento.

A avaliação do cumprimento da administração da terapêutica foi da responsabilidade dos pais e fez-se pelo controlo em cada consulta do número de cápsulas remanescentes e pelo estudo hematológico.

Definições

Foram adoptados os critérios e definições descritas a seguir, de acordo com os da literatura.

Acidente vascular cerebral – síndrome neurológica aguda resultante de oclusão de uma artéria ou por hemorragia, com sinais ou sintomas neurológicos resultantes da isquémia ⁽²⁷⁸⁾. Incluem os acidentes isquémicos transitórios (AIT) e os acidentes vasculares cerebrais por enfarte ou hemorragia.

Anemia de células falciformes (*) – situação clínica cujo diagnóstico se baseia na presença de anemia hemolítica crónica e hereditária, com evidência morfológica de fenómenos vaso-oclusivos em associação com a existência de HbS ⁽³²⁾.

Acidente isquémico transitório – episódio breve de disfunção neurológica causado por isquémia cerebral focal ou na retina, com sintomas típicos com uma duração de pelo menos uma hora e sem evidência de enfarte agudo ⁽¹⁷⁾.

Atrofia – é o mais pequeno volume de substância branca que se encontra numa criança com idade similar. Foi classificada para o possível grau por inspecção visual do ligeiro alargamento do espaço subaracnoideu, o qual foi considerado como uma variante normal. A atrofia classifica-se em focal, quando restrita a uma única região anatómica e generalizada ⁽²⁷⁸⁾.

Capacidade de difusão do CO (DLco) – o volume de monóxido de carbono que se transfere dos alvéolos para o sangue em cada minuto e por cada mmHg de gradiente de pressão ⁽⁹⁰⁾.

Crise drepanocítica – segundo “Diggs” qualquer síndrome que surge em doentes com anemia de células falciformes e inerente à própria doença ⁽¹⁰⁶⁾.

Delay time – tempo de duração de gelificação, entre o início da polimerização e a subida exponencial na formação de polímeros ⁽¹⁰⁶⁾.

Doença de células falciformes – inclui um grupo de doenças genéticas no qual o processo patológico resulta da presença de uma hemoglobina anormal (HbS) ⁽³⁹²⁾.

Doença pulmonar restritiva – situação clínica devida à diminuição dos volumes pulmonares sem redução do fluxo aéreo. Mede-se usando volumes pulmonares estáticos. Foi considerada quando a capacidade pulmonar total (TLC) está diminuída, inferior a 80% do valor previsto e com a razão FEV₁/FVC normal ou aumentada ⁽⁴⁹⁰⁾.

(*) Dos principais genótipos, a variante mais grave e também a mais frequente (70%) é a forma homozigótica ($\beta^S\beta^S$) ou anemia de células falciformes.

Doença pulmonar obstrutiva – situação clínica devida à redução do fluxo aéreo nas vias aéreas causada pela diminuição do diâmetro destas ou perda da sua integridade. Foi considerada quando o volume expiratório forçado num segundo (FEV₁) está diminuído, inferior a 80% do valor previsto e com a razão FEV₁/FVC inferior a 75% do valor previsto ⁽⁴⁹⁰⁾.

Efeito terapêutico adverso – qualquer evento ameaçador da vida ou qualquer episódio clínico passível de interferir temporária ou permanentemente com a capacidade do doente de continuar ou tolerar a medicação ⁽¹⁷⁹⁾.

Enfarte cerebral/Isquémia cerebral – enfarte cerebral ou região de alteração focal associada a isquémia, referida a uma área de sinal anormalmente aumentado na sequência de pulso intermédio e T₂ ⁽²⁷⁸⁾.

Enfarte silencioso – enfarte cerebral apenas observados na RMN-CE sem qualquer tradução clínica ⁽³²⁴⁾.

Episódio de dor – definido como uma dor músculo-esquelética, lancinante e periódica, auto limitada, que constitui um marcador clínico da ACF. Com uma duração de pelo menos duas horas, leva o doente a necessitar de hospitalização sendo explicada apenas pela própria anemia de células falciformes ⁽³³²⁾.

Episódio vaso-oclusivo – terminologia usada por Shapiro, em 1993, para acentuar a gravidade das crises dolorosas e diferenciá-las de todas as outras crises drepanocíticas: crises de sequestração esplénica ou hepática, aplástica e de hiper-hemólise ⁽³⁹²⁾. Neste estudo quando se fala de episódios vaso-oclusivos dolorosos (EVO) refere-se apenas aos episódios que levaram a internamento e não aos que ocorreram no domicílio.

Fase estável da doença – refere-se ao período sem complicações clínicas, ainda que mantenha uma hemólise crónica e uma vaso-oclusão subclínica constantes ⁽³⁹⁰⁾.

Fenotipo – características físicas, bioquímicas e/ou fisiológicas observadas num indivíduo ou numa célula resultante da interacção do meio ambiente com um gene ou genes ⁽³⁵⁸⁾.

Forma grave de ACF – verificação de, pelo menos, um dos seguintes critérios: 1) três ou mais EVO com internamento; 2) um ou mais episódios de STA por ano; 3) um episódio de AVC; 4) SDMO ⁽³⁷⁹⁾.

Gene – unidade de hereditariedade, sequência da cadeia de ADN capaz de transmitir informação genética e de expressar essa informação por codificação de uma cadeia polipéptídica ⁽³⁵⁸⁾.

Genotipo – constituição génica de um indivíduo no que diz respeito aos alelos de um locus ⁽³⁵⁸⁾.

Haplotipo – marcador polimorfo do ADN dentro do agrupamento génico da β -globina ⁽³⁵⁸⁾.

Hipoxémia – saturação da hemoglobina em oxigénio do sangue arterial (SatO_2) inferior a 92% e pressão parcial do oxigénio no sangue arterial (PaO_2) menor do que 70mmHg. Na ACF nos doentes assintomáticos a PaO_2 varia entre 74,2 a 90,8 mm Hg na idade dos doentes estudados ⁽³⁴³⁾.

Mielotoxicidade – foi definida pela contagem do número absoluto de neutrófilos inferior a 2.000/mm³, reticulócitos inferior a 80.000/mm³, plaquetas inferior a 80.000/mm³ ou diminuição 20% do valor inicial de Hb sem outros eventos nomeadamente crise de sequestração, infecção a parvovírus e hemólise ⁽³⁷⁹⁾.

Síndrome de disfunção multi-orgânica – alterações funcionais em mais de um órgão vital, em doentes com síndrome de resposta inflamatória sistémica ⁽⁴⁹⁸⁾.

Síndrome torácica aguda – situação clínica caracterizada por uma nova imagem de condensação pulmonar na radiografia do tórax, acompanhada de febre e/ou dor principalmente torácica, com ou sem sinais ou sintomas respiratórios e leucocitose, mas sempre com hipóxia de maior ou menor gravidade, segundo o CSSCD ⁽⁷³⁾.

Traço falciforme (**) – indica heterozigotia ($\beta\beta^s$) para o gene das células falciformes, é assintomático ⁽³⁹²⁾.

Toxicidade renal – foi definida como uma elevação de 50% sobre o valor normal da creatinina sérica ⁽¹⁷⁹⁾.

Toxicidade hepática – foi definida como a duplicação do valor inicial de GOT ⁽¹⁷⁹⁾.

(**) Apenas em alguns casos de stress oxidativo pode surgir patologia relacionada com a presença da HbS, nomeadamente diminuição da concentração urinária e hematúria, complicações oculares graves ^(220, 369).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Efectuou-se a informatização e a análise dos resultados através do Excel profissional para Windows Xp (Microsoft Co.). O tratamento estatístico dos dados foi efectuado com o programa SPSS (Statístic Programe Social Siencies), versão 11.5.0.

Os resultados foram agrupados e apresentados em quadros ou figuras, com o auxílio da versão 4.0 do programa Powerpoint (Microsoft Co.).

No que diz respeito ao estudo estatístico, foi efectuada inicialmente uma análise exploratória dos dados seguida por um estudo inferencial.

Como teste de ajustamento foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, tendo os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis sido usados para comparar as distribuições de duas ou mais amostras independentes, respectivamente. Para amostras emparelhadas utilizaram-se os testes de Wilcoxon e de McNemar.

Quanto às tabelas de contingência, utilizou-se o teste exacto de Fisher devido à baixa dimensão da amostra em estudo.

As correlações estudadas utilizaram os resultados dados pelo coeficiente de correlação de Spearman. Para tentar encontrar pontos de corte recorreu-se a técnicas de suavização através da utilização dos gráficos Lowess.

É de referir que todos os testes escolhidos utilizam técnicas não paramétricas devido à violação das condições necessárias à utilização de testes paramétricos.

O nível de significância escolhido foi $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DOS DOENTES.....	65
Idade	65
Sexo.....	65
Origem geográfica	66
Estrato sócio-económico	66
Factores genéticos.....	67
Genotipo β -globina	67
Genotipo α -globina	68
Cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$	68
Fenotipo hematológico.....	69
Fenotipo clínico.....	70
Estudo bioquímico.....	72
Haplotipos e HbF.....	73
Cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ e HbF.....	75
EVO e HbF	75
ESTUDO 1	76
SISTEMA CARDIO-RESPIRATÓRIO	76
Amostra populacional.....	76
Resultados da avaliação funcional respiratória e do estudo dos gases no sangue arterial.....	77
Estudo da relação dos parâmetros seleccionados com a doença pulmonar restritiva.....	80
Idade.....	81
Factores genéticos	81
Parâmetros hematológicos.....	81
Parâmetros clínicos.....	83
Estrato sócio-económico.....	83
Resultados das radiografias do tórax	83
Resultados da tomografia computadorizada de alta resolução.....	84
Estudo do sistema cardiovascular	87
Amostra populacional.....	87
Resultados do electrocardiograma e do ecocardiograma.....	87
Estudo da relação dos parâmetros hematológicos e clínicos com a lesão cardíaca	88
ESTUDO 2	91
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	91
Resultados da ressonância magnética nuclear crânio-encefálica	91
Estudo da relação entre os parâmetros seleccionados com a génese de enfartes silenciosos.....	94
Idade.....	94
Parâmetros genéticos.....	94
Parâmetros hematológicos.....	95
Parâmetros clínicos.....	95
Parâmetros sócio-económicos.....	95
Resultados do Doppler transcraniano.....	95
Resultados dos testes psicológicos	99
Estudo da influência dos parâmetros seleccionados no neurodesenvolvimento	100
Comparação das diferentes metodologias.....	101
ESTUDO 3	103
TERAPÊUTICA COM HIDROXIUREIA	103
Resposta clínica	105
Resposta hematológica	106
Resposta bioquímica.....	107
Toxicidade.....	108

CARACTERIZAÇÃO DOS DOENTES

Os resultados são apresentados de forma descritiva, de acordo com as variáveis definidas, para uma melhor compreensão das características da amostra populacional.

Dos 45 doentes com ACF que foram convocados, apenas 32 foram elegíveis. Dos doentes não seleccionadas, oito tinham regressado ao país de origem após o diagnóstico e orientação terapêutica, três residiam fora da área da grande Lisboa e não mostraram disponibilidade e dois doentes não participaram no estudo, por estarem em regime transfusional após AVC.

Idade

Os doentes tinham uma idade compreendida entre os sete e 18 anos inclusive, uma média de 11,5 anos (10,36-12,58) IC(95%). Os grupos etários com maior frequência são os correspondentes às idades entre os 7 e 9 anos e entre os 13 e 15 anos.

Sexo

A amostra encontra-se dividida equitativamente quanto ao sexo: 16 doentes do sexo masculino e 16 doentes do sexo feminino. No Quadro I observa-se que os doentes do sexo masculino têm idades médias superiores aos doentes do sexo feminino (12,25 e 10,56) sem diferenças significativas ($p=0,166$).

Quadro I. **Distribuição das idades por sexo**

Variável	Grupo	Média	IC (95%)	p
Sexo	Masculino	12,25	(10,48-14,02)	0,166
	Feminino	10,56	(8,87-12,15)	

Origem geográfica

A amostra populacional é constituída por doentes com origem geográfica em vários países africanos de língua oficial portuguesa (PALOP).

A Figura 4 mostra que 11 (37%) são de Angola, nove (30%) oriundos de S. Tomé e Príncipe, cinco (17%) de Cabo Verde, duas (7%) são irmãs com ascendentes paternos da Índia e maternos de Angola, sendo os três restantes com a mesma percentagem (3%), de Moçambique, Zaire e Portugal. Todos residem na área da grande Lisboa, excepto um, de origem caucasiana, que é natural e residente na Comporta, Alcácer do Sal.

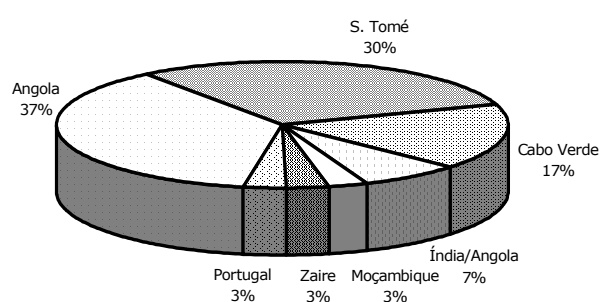


Figura 4. Distribuição da origem geográfica.

Estrato sócio-económico

A distribuição pelos diferentes estratos sócio-económicos definidos pela escala de Graffar adaptada ⁽²⁵⁶⁾ está descrita no Quadro II. Para efeitos de análise estatística procedemos ao agrupamento dos resultados em classes I, II-III, IV-V.

Cerca de 62,5% dos doentes pertenciam a estratos sociais mais desfavorecidos.

Quadro II. **Estrato socio-económico dos doentes**

Variável	Classe	Doentes (n=32)	
		Nº	(%)
Estrato socio-económico	I	0	0,00
	II-III	12	37,50
	IV-V	20	62,50

Factores genéticos

Genotipo β -globina

Foram estudados os polimorfismos (através de PCR seguido da digestão com os enzimas de restrição apropriados) que no seu conjunto definem os haplotipos no agrupamento da β -globina.

Conforme se observa no Quadro III, uma elevada percentagem de doentes ($n=17$) são portadoras do haplotipo Bantu na forma homozigótica (53,1%), não sendo relevante nenhum dos restantes haplotipos. Nas formas heterozigóticas predomina a associação Bantu/Benin com 12,5% ($n=4$) e em iguais percentagens as associações das variantes Bantu/Senegal e Bantu/Asiático 6,3% ($n=2$).

Quadro III. Distribuição dos haplotipos da β^S globina.

Haplotipos β -globina	Doentes ($n=32$)	
	Nº	(%)
Senegal/Senegal	3	9,4
Bantu/Bantu	17	53,1
Benin/Benin	2	6,3
Bantu/ Senegal	2	6,3
Bantu/Benin	4	12,5
Bantu/Asiático	2	6,3
Atípicos	2	6,3

Neste estudo, encontraram-se duas novas recombinações de haplotipos atípicos na população portuguesa, que representam 6,3% desta população estudada.

Um deles é homozigótico para um haplotipo atípico nos genes β^S . Este haplotipo atípico combina: o haplotipo I mediterrânico (que é igual ao Black 2 africano) na região 5' do agrupamento génico da β -globina, com o haplotipo Benin (típico dos alelos β^S originários do Golfo de Benin na região 3' do mesmo agrupamento génico).

Um outro, haplotipo atípico muito raro, em que o doente é heterozigota, apresenta o haplotipo Senegal no gene β^S de origem materna e haplotipo I de Orkin no gene β^S de origem paterna.

Genotipo α -globina

Os doentes com ACF podem apresentar em simultâneo a α -talassémia quer em homozigotia ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) ou em heterozigotia ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$).

O Quadro IV apresenta a distribuição das deleções da α -talassémia encontrada na população estudada, verificando-se que em 46,9% (n=15) se observou a presença da deleção de um gene α -globina correspondendo ao genotipo $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$. A homozigotia foi rara, representada em apenas 6,2% (n=2). A percentagem da heterozigotia é igual à dos doentes sem α -talassémia.

Quadro IV. **Distribuição das deleções da α -talassémia**

Genotipo α -globina	Nº doentes (n=32)	
	Nº	(%)
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	2	6,2
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	15	46,9
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	15	46,9

Cadeias $^G\gamma$ e $^A\gamma$

As cadeias γ da HbF são codificadas por dois genes intimamente ligados no agrupamento génico da β -globina, os genes $^G\gamma$ e $^A\gamma$. Em cinco doentes (15,6%) não foi detectada a relação da percentagem das cadeias γ da HbF dado que os valores da HbF eram muito baixos: 2,2; 0,8; 1,3; 1,2 e 1,7%.

Fenotipo hematológico

– Antes do Estudo

Foi calculada a média aritmética dos valores hematológicos registados nos processos clínicos até ao início do estudo, para se conhecer o fenotipo hematológico dos doentes - Quadro V.

Quadro V. **Parâmetros hematológicos até à data da realização do estudo**

Parâmetros	Média	IC (95%)
Hemoglobina	8,1	(7,81-8,42)
Leucócitos	13,9	(12,81-15,07)
Reticulócitos	13,1	(11,80-14,38)
Bilirrubina total **	*2,5	(1,92-3,10)

Hemoglobina em g/dl; leucócitos em $\times 10^3/\mu\text{l}$; valor absoluto de reticulócitos em percentagem; bilirrubina total em mg/dl.

*Mediana

** Englobou-se neste quadro o parâmetro bilirrubina para caracterização do quadro de hemólise.

Na selecção dos parâmetros hematológicos foram considerados os mais relevantes para a caracterização do quadro clínico: anemia (Hb), hemólise (reticulócitos e bilirrubina total) e infecção (leucócitos), dado que foi muito irregular o seguimento de estes doentes na Consulta de Imuno-Hematologia durante o período anterior ao início do estudo.

Neste estudo verificou-se em 14 doentes (43,8%) valores de Hb $\geq 8,1\text{g/dl}$. Em relação ao número de leucócitos os valores $\geq 13,9 \times 10^3/\mu\text{l}$, observou-se em 17 doentes (53%). Quanto ao número de reticulócitos, 16 doentes (40,6%) associaram-se a valores $\geq 13,1\%$.

– Durante o período de estudo

No Quadro VI descrevem-se os parâmetros hematológicos e de hemólise durante os três anos de estudo que resultam da média dos valores determinados nesse período. Incluíram-se ainda os valores da HbS e HbF e as cadeias $\epsilon\gamma$, parâmetros considerados importantes para a caracterização dos doentes com ACF.

Quadro VI. **Características hematológicas durante o período de estudo.**

Parâmetros	Média	IC (95%)
Hb	7,9	(7,58-8,26)
Leucócitos	11,0	(10,18-12,00)
Reticulócitos	12,0	(10,57-13,50)
Bilirrubina Total	*2,7	(2,30-4,01)
HbS	84,5	(82,64-86,36)
HbF	8,1	(6,05-10,09)
Cadeias $\epsilon\gamma$	43,6	(38,13-49,13)

Hb (hemoglobina) em g/dl; leucócitos em $\times 10^3/\mu\text{l}$; valor absoluto de reticulócitos em percentagem; bilirrubina em mg/dl; HbS, HbF e cadeias $\epsilon\gamma$ em percentagens.

*Mediana

Fenótipo clínico

– Antes do estudo

Fez-se a avaliação da história natural de cada doente até à data de início do estudo, através da análise dos processos clínicos da Consulta de Imuno-Hematologia - Quadro VII.

Quadro VII. **Fenotipo clínico dos doentes até à data da realização do estudo**

Variável	Complicações	Nº episódios	Nº doentes (n=32)	
			Nº	(%)
Fenotipo clínico	Episódio vaso-oclusivo	212	28	87,50
	S. torácica aguda	47	19	59,38
	Crise de sequestração	6	3	9,37
	Sépsis	1	1	3,12
	Dactilite	10	10	31,20
	Crise aplástica	4	4	12,50
	Crise hiper-hemólise	55	16	50,00
	Osteomielite	2	2	6,25
	Priapismo	1	1	3,12
	Litíase vesicular	15	15	46,87

Dos parâmetros analisados, os EVO (consideraram-se apenas os casos de internamento) representam a maior complicação em 87,5% dos doentes, seguem-se os casos da STA em 59,38%. Estas duas complicações são, sem dúvida, as mais frequentes nos doentes com ACF.

No que respeita à sépsis, osteomielite e priapismo, apesar de surgirem num número muito reduzido em comparação com as restantes complicações, elas evidenciam-se na mortalidade (sépsis e osteomielite) e na morbilidade (priapismo) da doença.

– Durante o período de estudo

Procedeu-se ao registo do fenotipo clínico dos doentes durante os três anos de estudo - Quadro VIII.

Quadro VIII. **Fenotipo clínico dos doentes durante o período do estudo**

Variável	Complicações	Nº episódios	Nº doentes (n=32)	
			Nº	(%)
Fenotipo clínico	Episódio vaso-oclusivo	57	18	56,3
	Síndrome torácica aguda	15	8	25,0
	Acidente vascular cerebral	1	1	3,1
	Crise hiper-hemólise	1	1	3,1
	Crise aplástica	1	1	3,1

Durante este período, os EVO continuam a representar a maior percentagem (56,3%) de eventos clínicos, seguindo-se as STA (25%). Um dos doentes evidenciou sete episódios de STA durante os três anos de estudo. Registou-se um AVC num doente, com sete anos de idade, ao fim de 18 meses do início do protocolo, uma crise de hiperhemólise pelo citomegalovírus e uma crise aplástica pelo vírus de Epstein-Barr.

Estudo bioquímico

No Quadro IX são referidos os parâmetros bioquímicos relacionados com as funções renal, hepática e com o metabolismo do ferro usados durante o estudo para avaliar as eventuais complicações. Não se encontraram alterações em relação aos valores de referência para os respectivos grupos etários.

Na população estudada os valores de ferritina de 129,4 ng/dl, parâmetro também dentro da normalidade atendendo a que 95% dos doentes transfundidos fizeram sempre em simultâneo terapêutica quelante.

Quadro IX. **Estudo bioquímico durante o período de estudo**

Parâmetros	Média	IC (95%)
Ureia	16,9	(15,50-18,38)
Creatinina	0,4	(0,39-0,48)
GOT	43,3	(38,42-48,12)
GPT	20,6	(18,61-22,64)
γ GT	*12,3	(12,11-20,27)
Fosfatase Alcalina	155,0	(137,08-172,84)
T. Protrombina	15,8	(15,6-16)
LDH	1240,5	(1110,71-1370,20)
Siderémia	93,1	(81,40-104,87)
CTFF	340,2	(317,26-363,17)
Ferritina	*129,4	(96,68-322,66)

Ureia e creatinina em mg/dl; Transaminase glutâmica oxalacética (GOT), e pirúvica (GTP) em UI/l; Gama-glutamil transpeptidase (γ GT) em UI/l; Fosfatase alcalina em mg/dl; Tempo de protrombina (T. Protrombina) em segundos; Desidrogenase láctica (LDH) em mg/dl; Siderémia e capacidade total de fixação de ferro (CTFF) em µg/dl; Ferritina em ng/dl.

*Mediana.

Haplotipos e HbF

Considerando a grande variabilidade de haplotipos encontrada, para a análise estatística procedeu-se ao seu agrupamento, segundo os critérios adoptados por Rieder ⁽³⁶⁴⁾. Assim, foram considerados os três principais haplotipos, Senegal, Bantu e Benin, agrupando-se os restantes segundo o valor da HbF. O Quadro X mostra a relação existente entre os haplotipos e o valor da HbF em percentagem.

Quadro X. **Relação entre os haplotipos e os valores da HbF**

Haplotipos	Valores de HbF	
	Média	IC (95%)
Haplotipo Senegal	13,5	(8,04-18,96)
Haplotipo Benin	7,4	(1,89-12,93)

Haplotipo Bantu	5,8	(4,05-7,55)
-----------------	-----	-------------

Os valores médios de HbF 13,5% são mais elevados para os doentes portadores do haplotipo Senegal. O haplotipo Bantu apresenta valores médios de HbF 5,8% muito inferiores ao grupo anterior. O haplotipo Benin com valores médios de HbF 7,4% é considerado um haplotipo intermédio para a evolução clínica dos doentes.

Quanto aos dois haplotipos atípicos encontrados nesta investigação e já referidos, os mesmos foram agrupados segundo o valor da HbF. O doente que é heterozigótico para um haplotipo atípico tem um valor de HbF 16,4% e aquele que é homozigótico para outro haplotipo atípico, tem valores de HbF 2,2%. Os dois apresentaram boa evolução clínica.

A Figura 5 é a representação gráfica do Quadro X na qual se observa a comparação dos haplotipos com os valores da HbF. Verifica-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,014$) dos valores médios da HbF nos três diferentes haplotipos.

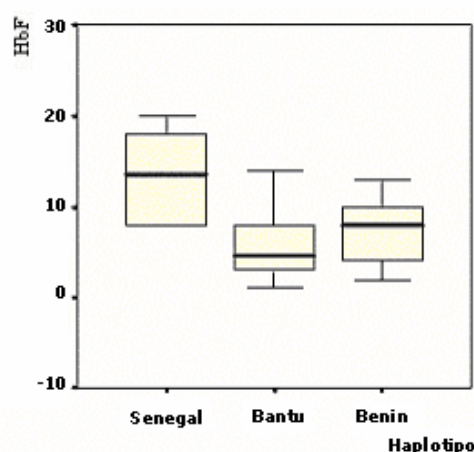


Figura 5. Comparação entre os haplotipos e os valores da HbF.

Cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ e HbF

Dada a importância dos factores genéticos na evolução da ACF, foi avaliada nesta amostra populacional a sua relação com os factores mais relevantes na evolução clínica da ACF, a HbF e o número de EVO.

Na avaliação da relação das cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ com a HbF, não se obteve uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,08$) - Figura 6A. Usou-se então o coeficiente de correlação de Spearman e verificou-se a existência de uma correlação positiva ($r=0,4$) com significado estatístico entre as cadeias $G\gamma$ e os valores da HbF ($p=0,047$). Da observação da Figura 6B pode-se afirmar que as cadeias $G\gamma$ são determinantes da HbF nesta amostra populacional.

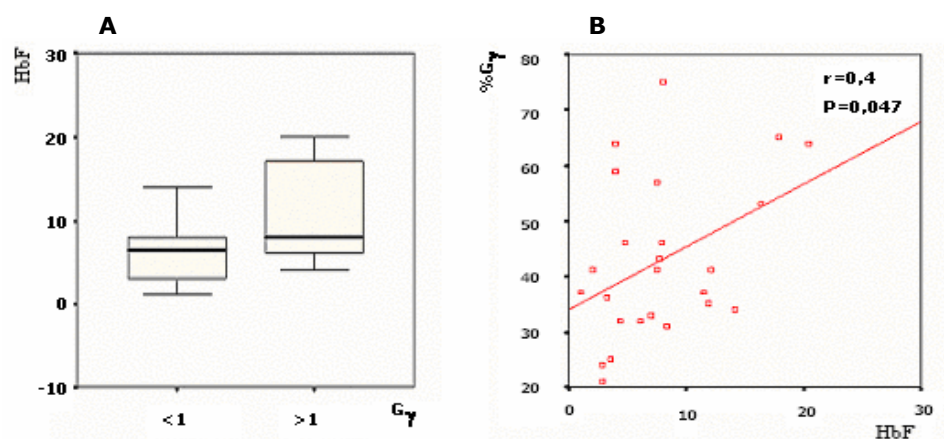


Figura 6. Comparação entre a razão das cadeias $G\gamma$ e a percentagem da HbF (A) e a sua correlação (B).

EVO e HbF

Uma vez conhecida a importância dos marcadores hematológicos (HbF) e clínicos (EVO), quer na evolução quer no prognóstico da ACF, avaliou-se a relação destes dois parâmetros. Verificou-se que valores de HbF de 9,1% se associaram a menor número de EVO e valores de HbF de 6,8% corresponderam a maior número de EVO, embora sem significado estatístico ($p=0,123$).

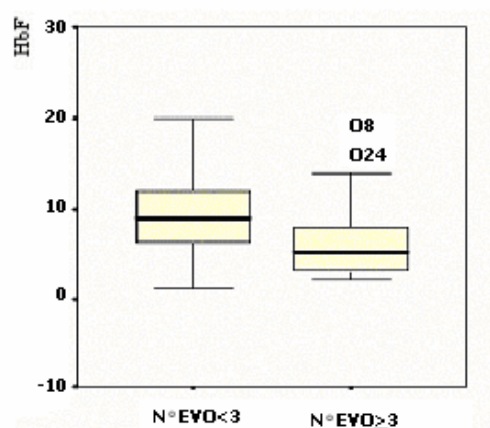


Figura 7. Comparação entre o número de EVO e os valores da HbF.

ESTUDO 1

SISTEMA CARDIO-RESPIRATÓRIO

Amostra populacional

Num dos 32 doentes que foram elegíveis, verificou-se ao fim de 18 meses do estudo, um episódio de AVC, implicando início de regime transfusional regular (RTR), o que não permitiu a sua continuidade no estudo. Dos restantes, outro doente abandonou o estudo por ter regressado ao país de origem.

Ambos eram do sexo masculino, razão pela qual este grupo passou a ser constituído por 14 doentes, sem alterações significativas do grupo etário. No total foram elegíveis 30 doentes.

Foi incluído neste estudo um grupo de controlo (GC), recrutado através da Consulta de Imuno-Hematologia e constituído por 30 crianças e adolescentes com idades compreendidas entre os sete e 18 anos, emparelhados para o sexo e para a origem geográfica com o grupo dos doentes.

Resultados da avaliação funcional respiratória e do estudo dos gases no sangue arterial

Para avaliar a existência de lesão pulmonar, procedeu-se à comparação de parâmetros somatométricos do GC com os dos doentes do estudo.

Os valores médios das idades e da altura não diferem estatisticamente entre os dois grupos, mas existem diferenças significativas no peso e no valor da Hb (respectivamente $p=0,004$ e $p=0,001$). Os valores da Hb média excluem doença hematológica no GC, com excepção de um doente com sete anos de idade a quem foi diagnosticada uma anemia carencial por deficiência em ferro ($Hb=10$ g/dl) e corrigida antes da execução dos exames para AFR - Quadro XI.

Quadro XI. Comparação entre os doentes e o grupo do controlo

	Idade (anos)		Altura (cm)		Peso (kg)		Hb (g/dL)	
	ACF	GC	ACF	GC	ACF	GC	ACF	GC
Média	11,6	11,9	140,0	150,0	33,3	42,1	8,2	12,4
DP	3,2	2,7	13,9	15,3	9,9	13,3	0,4	1,1
Máximo	18	18	175,0	175,0	64,0	69,0	10,3	14,3
Mínimo	7	7	122,0	117,0	23,0	21,0	6,2	10,0
p	NS*		NS*		$p=0,004$		$p=0,001$	

DP= Desvio-Padrão; GC= grupo de controlo (n=30)

* $P>0,05$

A Figura 8 apresenta a comparação dos resultados da AFR entre os indivíduos do GC e os doentes. No GC as médias da razão FEV_1/FCV , das percentagens do valor previsto do FEV_1 , e da TLC_{He} foram respectivamente 91,94 (90,37-93,50), 100,09 (95,78-104,40) e 89,58 (85,95-93,21). A média da DL_{CO} em relação ao valor previsto é 86,77 (81,77-91,78).

No GC, em nenhum caso se verificou existirem volumes ultrapassando os valores limite do normal, segundo os critérios pré-definidos e a razão FEV_1/FVC é similar nos dois grupos, controlos e doentes.

Observando as diferenças das médias dos parâmetros estudados entre os indivíduos do GC e os doentes, verificou-se que exceptuando a razão FEV_1/FVC ($p=0,751$), todos os restantes parâmetros, FEV_1 , TLC_{He} e DL_{CO} apresentaram valores mais elevados no GC com significado estatístico ($p=0,001$, $p=0,006$ e $p=0,007$ respectivamente).

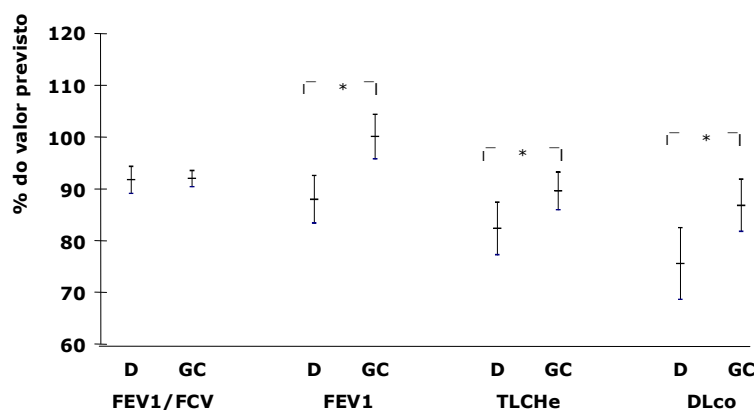


Figura 8. Comparação entre as provas da função pulmonar da 1ª avaliação dos doentes e o GC.

(D)=Doentes ($n=30$); (GC)=grupo de controlo ($n=30$); FEV_1 =Volume Expiratório Forçado em 1 segundo; TLC =Capacidade Pulmonar Total por diluição do hélio; $FEV_1/FVC=FEV_1$ em % da FVC; DL_{CO} =Capacidade de Difusão Pulmonar pelo monóxido de carbono %=percentagem do valor teórico sobre o medido, excepto para a razão FEV_1/FVC .

* $p<0,05$

Para estudar a evolução dos parâmetros para a AFR no grupo de doentes, Figura 9, realizaram-se duas avaliações com intervalo de dois anos e verificou-se que: as médias da razão FEV_1/FVC e do FEV_1 diminuíram respectivamente de 91,63 (89,09-94,17) para 91,15 (88,71-93,58) e de 87,44 (82,09-94,17) para 86,13 (81,26-91,02) entre a 1ª avaliação e a 2ª avaliação. Esta diminuição não evidenciou significado estatístico ($p=0,992$ e $p=0,813$ respectivamente).

No que respeita a volumes pulmonares estáticos, as médias da TLC_{He} entre a 1ª avaliação 82,17 (77,26-87,08) e a 2ª avaliação 71,45 (67,46-75,44) diminuíram. Tal diminuição evidenciou significado estatístico ($p=0,001$).

A DL_{CO} também diminuiu entre a 1ª avaliação e a 2ª avaliação; as diferenças entre as médias 76,38 (69,49-83,26) e 71,14 (66,72-75,56) não evidenciaram significado estatístico ($p=0,611$).

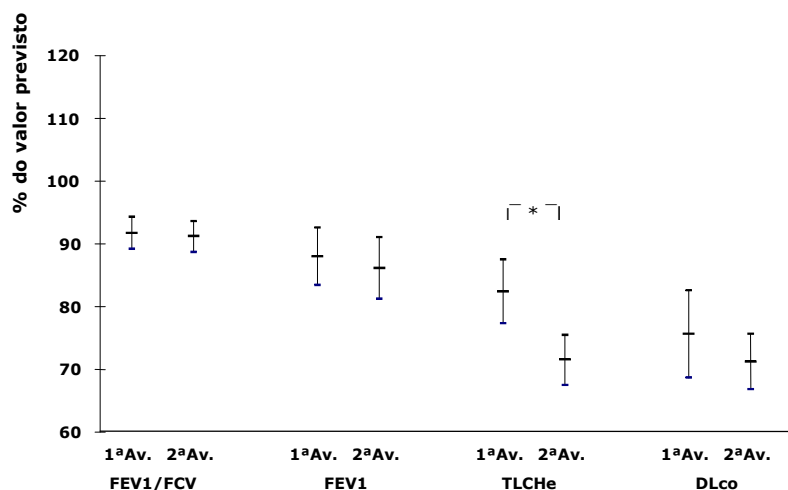


Figura 9. Comparação entre as provas da função pulmonar dos doentes entre a 1ª e a 2ª avaliação.

* $P=0,05$

Os volumes pulmonares apresentaram valores inferiores nos doentes em relação aos indivíduos do GC, mas não se verificaram diferenças deste parâmetro entre os doentes com ou sem STA.

O estudo da AFR diagnosticou em 70% dos doentes DPR e apenas um doente evidenciou um padrão obstrutivo ligeiro com uma diminuição do FEV_1 (69%) associado a uma diminuição da razão FEV_1/FVC (73,3%), o referido doente corresponde ao caso com maior número de STA na série estudada.

O estudo dos gases no sangue arterial apresentado na Figura 10 faz parte integrante dos testes da função pulmonar; no entanto, sendo o estudo feito durante a fase estável da doença registaram-se apenas os valores de PaO_2 e $SatO_2$, como indicadores da integridade da membrana alvéolo-capilar.

Nos indivíduos do GC as médias da PaO_2 98,9 (95,23-102,58) e da $SatO_2$ 97,43 (97,09-97,77) foram mais elevadas do que nas crianças com ACF, com significado estatístico (respectivamente $p=0,004$ e $p=0,032$).

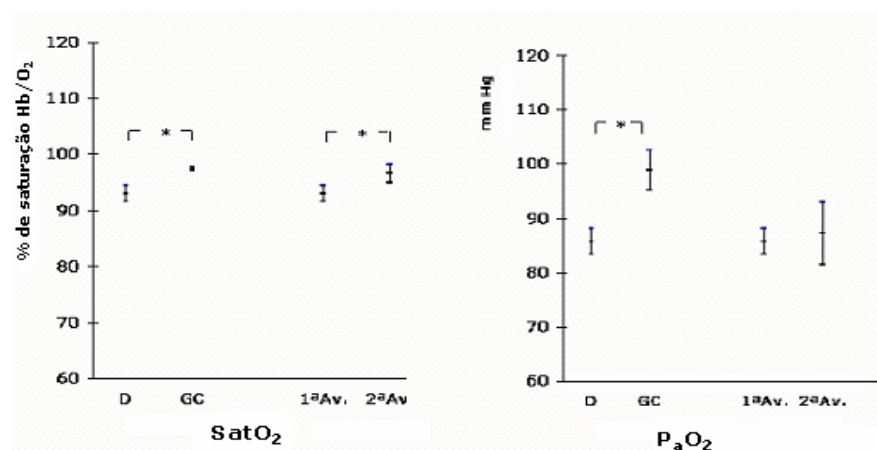


Figura 10. Comparação entre a SatO₂ e a PaO₂ entre o grupo de controlo e a 1ª avaliação dos doentes e entre a 1ª e 2ª avaliação dos doentes.

(D)=doentes (n=30); (GC)=grupo de controlo (n=30); PaO₂=pressão parcial de oxigénio em mmHg; SatO₂=é a saturação arterial da Hb em O₂ medida em percentagem.

* P=0,05

Não se verificaram diferenças significativas entre a 1ª e a 2ª avaliação no que respeita à média da PaO₂ (p=0,443). No entanto, em relação à SatO₂ foram encontradas diferenças significativas (p=0,002) entre a 1ª e a 2ª avaliação, com médias 93,17 (91,73-94,60) e 96,55 (95,05-98,05). Estas diferenças apesar de terem evidenciado significado estatístico não têm significado clínico, uma vez que os resultados se encontram dentro dos valores considerados normais para esta patologia.

Estudo da relação dos parâmetros seleccionados com a doença pulmonar restritiva

Para identificar indicadores de prognóstico para a doença pulmonar restritiva (DPR) seleccionaram-se parâmetros genéticos, hematológicos, clínicos e sócio-económicos.

Idade

A média das idades dos doentes sem doença restritiva é de 15 anos, e nos doentes com doença restritiva é de 14,73 anos; esta diferença não é significativa ($p=0,597$).

Factores genéticos

Genótipo β -globina: a influência dos três principais haplotipos na DPR não evidenciaram significado estatístico ($p=0,352$). Verificou-se que os doentes com DPR, na grande maioria são portadores do haplotipo Bantu (53,3%), seguindo-se o haplotipo Senegal (6,25%) e o haplotipo Benin (3,13%).

Genótipo α -globina: no estudo da deleção da α -talassémia como indicador de prognóstico para a lesão pulmonar não se encontraram diferenças com significado estatístico ($p=0,097$), entre os doentes com número de genes α normal e os que apresentam genes α deleccionado; apenas dois destes doentes (6,6%) eram portadores de homozigotia para a deleção da α -talassémia.

Cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$: na avaliação das cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ também não se verificaram diferenças com significado estatístico ($p=0,314$) entre o grupo de doentes com percentagem de cadeias $G\gamma>1$ e o grupo de doentes com cadeias $G\gamma<1$.

Parâmetros hematológicos

Considerando-se a importância da HbF e da Hb na evolução da ACF e na ausência de significado estatístico destas variáveis, procedeu-se à análise estatística através de um gráfico de Lowess, que permitiu evidenciar a relação entre HbF e a DPR determinando o valor de corte. Com este valor calculou-se o risco de um doente com HbF ter uma DPR. Assim obteve-se um valor de *odds ratio* (O.R.)= 2.11 (0,28-15,77), o que significa que um doente com HbF<13% tem aproximadamente duas vezes mais probabilidades de ter DPR do que um doente com HbF \geq 13% ($p=0,589$).

Também em relação à Hb, se utilizou um gráfico de Lowess para obter um ponto de corte que dividiu os doentes em valores de Hb \geq 8,5 g/dl e <8,5 g/dl. Os resultados obtidos permitiram concluir que um doente com Hb<8,5 g/dl tem dez vezes mais probabilidade de ter DPR do que um doente com valor de Hb \geq 8,5 g/dl [O.R.=10 (1,342-74,512) $p=0,013$].

Deve-se referir que este valor de O.R. na maioria dos casos está seguramente sobrestimado devido à baixa dimensão da amostra.

Embora sem significado estatístico considera-se que alguns dos parâmetros hematológicos estudados possam ser relevantes sob o ponto de vista clínico. Usou-se um gráfico de dispersão para aqueles doentes cujo valor de **p** mais se aproximou da significância estatística.

Assim, dos restantes parâmetros hematológicos apenas o número de eritrócitos em valores absolutos, a concentração da Hb globular média em mg/dl (CHGM) e o número de leucócitos em valores absolutos apresentaram uma tendência para influenciar a evolução da DPR.

As médias dos eritrócitos e da CHGM dos doentes com DPR são mais baixos do que os doentes sem DPR; eritrócitos $2,84 \times 10^6/\mu\text{l}$ (2,64-3,04) *versus* $3,13 \times 10^6/\mu\text{l}$ (2,73-3,53) e CHGM 33,09 g/dl (32,67-33,50) *versus* 33,6 g/dl (32,58-34,62) correspondendo a diferenças estatísticas não significativas (respectivamente $p=0,185$, $p=0,280$). A média do número de leucócitos dos doentes com DPR apresentou uma tendência inversa observando-se valores mais elevados nos doentes com DPR do que nos doentes sem DPR $11,79 \times 10^3/\mu\text{l}$ (10,08-13,42) *versus* $10,71 \times 10^3/\mu\text{l}$ (9,56-11,86), sem significado estatístico ($p=0,142$) - Figura 11.

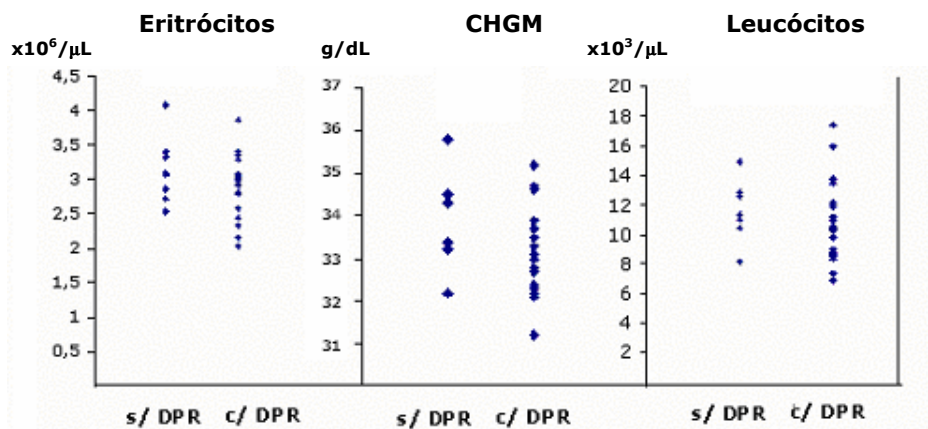


Figura 11. Dispersão dos valores hematológicos em relação à doença pulmonar restritiva

No que diz respeito ao valor do número de plaquetas nos doentes sem ou com DPR, verificou-se que os doentes sem DPR apresentam valores médios inferiores aos doentes com DPR, respectivamente 252,293/ μ l (128,162-377,704) e 301,458/ μ l (148,646-454,271), diferença estatisticamente não significativa ($p=0,298$).

Parâmetros clínicos

No estudo da relação entre parâmetros clínicos e padrão de lesão encontrada a nível pulmonar, verificou-se que um doente que apresente um número de EVO ≥ 3 /ano, tem aproximadamente seis vezes mais probabilidades de apresentar DPR do que outro com um número de EVO < 3 /ano [O.R.=6 (0,78- 48,14) $p=0,102$] sem significado estatístico.

Os dois *outliers* encontrados neste estudo correspondem aos doentes com maior número de EVO, sem nenhum deles apresentar internamentos por STA, no entanto nos dois doentes verificou-se a existência de DPR.

As STA não são factores de risco para a DPR [O.R.= 0,4 (0,06-2,47) $p=0,419$], no entanto também se observaram dois *outliers*, um relativo a um doente com uma evolução clínica severa devida ao grande número de EVO e que apresenta um padrão restritivo. O outro *outlier* corresponde ao doente com maior número de episódios de STA durante este estudo e que manifesta um padrão obstrutivo.

Em 17 doentes (56,6%) verificou-se a existência da STA e em 11 dos doentes (36,6%) a STA estava associada a padrão restritivo; em apenas 8 dos doentes (26,6%) com DPR se observou maior número da STA (≥ 1 /ano).

Estrato sócio-económico

Procedeu-se ao estudo da relação entre o estrato sócio-económico e a DPR não se tendo verificado qualquer associação com significado estatístico ($p=0,500$).

Resultados das radiografias do tórax

Os achados obtidos através dos radiogramas do tórax revelaram em 80% dos doentes um valor de índice cardiotorácico $\geq 50\%$. Nos doentes com alterações do parênquima pulmonar estas foram inespecíficas.

Com a finalidade de avaliar a possível associação entre cardiomegalia e diminuição do volume pulmonar apurou-se uma correlação negativa ($r=-0,334$) entre as referidas variáveis, embora sem significado estatístico ($p=0,07$).

Resultados da tomografia computadorizada de alta resolução

A TCAR revelou alterações pulmonares em 13 (43,3%) doentes, sete do sexo masculino (53,8%) e seis do sexo feminino (46,2%).

As principais alterações encontradas foram traços fibróticos em 12 crianças (92,3%), traços fibróticos com diminuição do volume lobar num doente (7,7%) e alterações discretas da densidade em três doentes (23%).

No primeiro exame não se encontraram alterações em quatro doentes (30,8%), e no segundo exame as alterações foram idênticas às do primeiro, em três doentes (23,1%).

Quanto à localização da lesão predominante, as alterações fibróticas, foram mais frequentes nos lobos superiores em 91% em relação aos lobos inferiores 75%, e apenas num doente a fibrose se situou nas zonas periféricas do pulmão.

No que respeita ao número de lobos atingidos, comprovou-se um valor compreendido entre dois e três lobos por cada doente. Não se verificou relação entre o número de lobos atingidos e o número de STA. Um doente sem antecedentes de infecções respiratórias apresentava alterações fibróticas ainda que discretas e apenas num lobo, o que parece reflectir que a TCAR é um bom exame nos casos subclínicos de micro-oclusão vascular para o diagnóstico das primeiras manifestações de fibrose⁽³³¹⁾.

Num doente com hipertensão pulmonar documentada pela ecocardiografia a que se associava uma asma moderada, na TCAR visualizou-se um padrão mosaico com áreas de menor atenuação traduzindo hiperinsuflação e bronquiectasias na língula, provavelmente relacionadas com asma brônquica, a que se associavam alterações fibróticas resultantes da repetição dos fenómenos de micro-oclusão vascular.

Na maioria dos doentes com sinais anómalos na TCAR verificou-se um padrão restritivo (53,8%); apenas num caso se verificou padrão obstrutivo (7,7%) precisamente naquele que evidenciou maior número de STA.

As figuras seguintes apresentam imagens de TCAR que documentam a existência de lesão pulmonar durante a fase estável da doença.

A Figura 12, representa a TCAR num corte ao nível da carina, onde se observam imagens lineares e reticulares traduzindo alterações fibróticas residuais no segmento posterior do lobo superior do pulmão direito com discreta alteração da arquitectura pulmonar e enfisema retráctil; tais sinais continuaram a ser evidentes e sobreponíveis nos dois exames das TCAR realizados com intervalo de dois anos.



Figura 12. Alterações fibróticas residuais encontradas num doente com 13 anos de idade.

Na Figura 13, correspondente a outro doente, num corte ao nível dos vasos supra-aórticos observam-se imagens reticulares no lobo superior do pulmão direito traduzindo alterações fibróticas, associando-se moderado enfisema retráctil lesão estável no exame realizado de controlo.

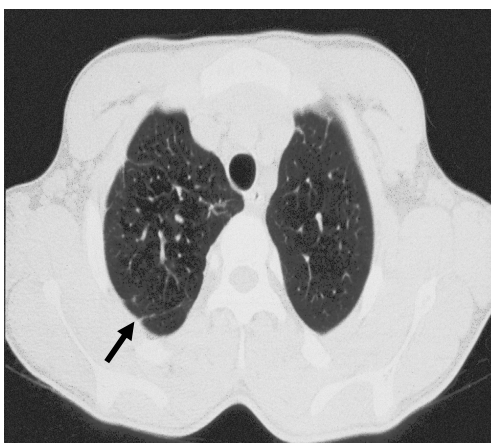


Figura 13. Imagens reticulares no lobo superior do pulmão direito, com moderado enfisema retráctil num doente com oito anos de idade.

A Figura 14 refere-se a um doente com sete anos de idade e HbSS, com um processo de consolidação no lobo inferior do pulmão esquerdo, traduzindo processo agudo (STA). Visualizam-se ainda no mesmo contexto alterações em “vidro despolido” no pulmão direito em associação a aspectos residuais. Este doente foi o que apresentou maior número de STA durante toda a sua evolução clínica.

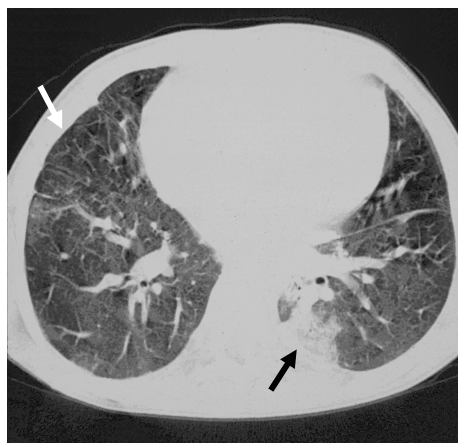


Figura 14. Imagem de densificação parenquimatosa com broncograma aéreo no lobo inferior do pulmão esquerdo (↘) e alterações reticulares com áreas em “vidro despolido” no lobo inferior do pulmão direito (↗)

Estudo do sistema cardiovascular

Amostra populacional

Fez-se a avaliação cardiovascular a todos os doentes para definir as alterações cardíacas e avaliar se estas são repercussão da DPR ou da própria anemia crónica.

Segundo o desenho do estudo, em todos os doentes se realizou um exame clínico completo, radiografia do tórax, electrocardiograma (ECG), e ecocardiograma (EcoCG) nas consultas programadas anualmente, mas somente são referidos neste capítulo os resultados dos ECG e dos EcoCG.

Resultados do electrocardiograma e do ecocardiograma

As alterações cardíacas encontradas nos ECG das crianças com ACF, correspondem em 53,3% a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e em 10% hipertrofia ventricular direita (HVD). Um doente tinha patologia cardíaca de base: síndrome de Wolff-Parkinson-White, cujas alterações de condução interferem com a avaliação de alguns parâmetros estudados; por isso foi excluído da avaliação do intervalo PR - Quadro XII

Quadro XII. Parâmetros electrocardiográficos de acordo com o sexo.

Doentes (n=30)	Nº de ECG	ECG		Alterações electrocardiográficas			
	Total	Normal	Alterado	HVE	HVD	Alt. ST-T	Alt. P-R
Masculino	14	5	9	9	2	0	0
Feminino	16	9	7*	7	1	0	0
Total	30	14	16	16	3	0	0
%	100	46,7	53,3	53,3	10	0,00	0,00

ECG= electrocardiograma; HVE= hipertrofia ventricular esquerda; HVD= hipertrofia ventricular direita; Alt. ST-T= alterações do segmento ST e onda T; Alt. P-R= alterações do intervalo PR.

*Síndrome de Wolff-Parkinson-White observado num dos doentes.

Através do ecocardiograma em 26 doentes (86,7%) verificaram-se alterações cardíacas traduzidas predominantemente por dilatação ventricular esquerda (DVE), em três doentes (10%) por dilatação ventricular direita (DVD) e em 10 doentes (33,3%) por dilatação auricular esquerda (DAE) - Quadro XIII.

Quadro XIII. **Parâmetros ecocardiográficos de acordo com o sexo.**

Doentes (n=30)	Nº de EcoCG	EcoCG		Alterações ecocardiográficas					
	Total	Normal	Alterado	DVE	DVD	DAE	SIV	ppVE	Alt. FE
Masculino	14	1	13	13	2	4	0	2	0
Feminino	16	3	13	13	1	6	0	2	0
Total	30	4	26	26	3	10	0	4	0
%	100	13,3	86,7	86,7	10	33,3	0,00	13,3	0,00

EcoCG= ecocardiograma; DVE= dilatação ventricular esquerda; DVD= dilatação ventricular direita; DAE= dilatação auricular esquerda; SIV= septo interventricular; ppVE= parede posterior do ventrículo esquerdo; Alt. FE= alteração da fracção de encurtamento.

Em 13,3% dos doentes foram identificados sinais sugestivos de hipertrofia da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE) não acompanhados de alterações no septo interventricular (SIV).

Não se registaram alterações da fracção de encurtamento (FE) o que é compatível com uma função sistólica conservada.

A existência de hipertensão pulmonar ligeira com pressão da artéria pulmonar sistólica de 50 mmHg apenas se verificou num doente, no qual se detectara o valor de Hb média mais baixo (6,2 g/dl) e asma brônquica associada.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas quanto à idade entre os doentes com ou sem sinais ecográficos de DVE ($p=0,282$). O número de ecocardiogramas alterados foi igual nos dois sexos.

Estudo da relação dos parâmetros hematológicos e clínicos com a lesão cardíaca

Relacionando os **parâmetros hematológicos** com os sinais ecocardiográficos do VD, verificou-se que valores médios de HbF 8,3% (6,34-10,05) ($n=27$), associaram-se à normalidade ecocardiográfica, enquanto que valores médios de HbF 2,5% (1,58-3,42) ($n=3$) verificaram-se sinais de DVD com significado estatístico ($p=0,011$).

A relação dos sinais ecocardiográficos com ou sem DVD e os valores médios de Hb 7,5g/dl (6,80-6,09) e 7,9g/dl (7,6-8,4) não apresenta significado estatístico ($p=0,22$).

Em relação à HbF, o valor médio de 14% (7,50-20,50) associou-se a sinais ecocardiográficos do VE normais, enquanto que o valor médio de 6,59% (4,84-8,35) associou-se a DVE com significado estatístico ($p=0,010$).

Quanto ao valor médio da Hb verificou-se que valores de 8,3 g/dl (7,78-8,97) associaram-se à normalidade dos sinais electrocardiográficos do VE ($n=13$) e valores de 7,59 g/dl (7,22-7,92) associaram-se a HVE ($n=17$) com significado estatístico ($p=0,039$). No estudo ecocardiográfico do VE não se verificou relação estatisticamente significativa ($p=0,157$) entre os valores médios da Hb de 8,37 g/dl (7,30-9,40) e de 7,8 g/dl (7,47-8,20) sem ou com DVE.

Usou-se o coeficiente de correlação de Spearman para avaliar a relação da Hb média, da HbF e da HbS como parâmetros de repercussão na DVE. Verificou-se correlação negativa entre os valores da Hb média ($r=-0,391$) e da HbF ($r=-0,34$) e a existência de DVE, com significado estatístico para a Hb média ($p=0,032$) e sem significado estatístico para a HbF ($p=0,06$) – Figura 15.

O valor médio de HbS correlacionou-se positivamente ($r=0,191$) com a existência de DVE; quanto mais elevados os valores de HbS mais evidente foi a verificação de DVE, embora sem significado estatístico ($p=0,312$).

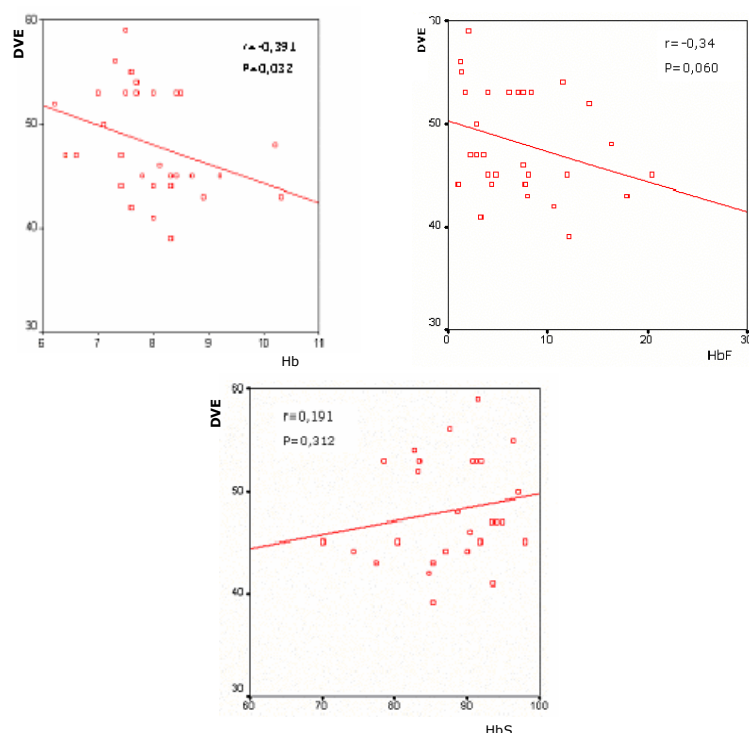


Figura 15. Parâmetros ecocardiográficos das DVE em função da concentração da Hb média em g/dl (à esquerda), percentagem da HbF (à direita) e percentagem da HbS (em baixo).

Quanto aos **parâmetros clínicos** após observação da influência que a DPR poderia ter na elevada percentagem DVE encontrada no ecocardiograma, comprovou-se não existirem diferenças estatisticamente significativas entre o número de casos com DPR e o número de doentes com DVE ($p=0,257$). Quanto à relação entre o número de EVO e o número de DVE os resultados também não evidenciaram significado estatístico ($p=0,373$).

Nos três doentes em que se observou DVD, apenas em dois (6,6%) se verificou uma evolução clínica desfavorável associada a maior número de EVO e da STA. Um destes doentes, com hipertensão pulmonar, faleceu por insuficiência respiratória um ano após ter terminado o estudo de investigação. O outro doente evidenciara nos dois primeiros anos de vida uma má evolução clínica devido ao número elevado da STA, após os quais a doença evoluiu com DVD ligeira [VD=21mm (VN= 8 a 19 mm)] sem repercussão na função cardíaca.

ESTUDO 2

SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Com base no objectivo definido avaliaram-se as alterações relacionadas com o processo da micro-oclusão vascular cerebral e fez-se a pesquisa de marcadores de prognóstico que afectam a função do sistema nervoso.

Utilizaram-se duas metodologias imagiológicas de neurodiagnóstico, a ressonância magnética nuclear crânio-encefálica (RMN-CE) e a ultrassonografia com Doppler transcraniano (DTC), e um conjunto de quatro testes psicológicos.

A data de início desta fase da investigação, a não existência de critérios que definam o intervalo de tempo aconselhável entre os vários exames da RMN-CE e limitações relacionadas com o seu custo/benefício, determinaram que este exame não fosse repetido. O mesmo aconteceu com os testes neuropsicológicos pela probabilidade de os resultados serem influenciados pelo curto intervalo de tempo.

Resultados da ressonância magnética nuclear crânio-encefálica

Nos 30 doentes incluídos neste estudo, a ressonância magnética nuclear crânio-encefálica (RMN-CE) foi realizada com a idade média de 13,9 anos ($DP \pm 3,3$ anos).

Destes 30 doentes, 12 (40%) apresentaram lesões de enfarte /isquémia, atrofia, ou ambos, com a seguinte distribuição: 5 (16,7%) com lesões de enfarte/isquémia sem atrofia, 2 (6,7%) só atrofia e 5 (16,7%) com enfarte/isquémia e atrofia. A frequência encontrada de ES no total foi de 33,3%.

Observou-se num doente (3,3%), estenose arterial nos segmentos supra-clinoideus das artérias cerebrais média e anterior compatível com vasculopatia grave.

Durante o tempo do estudo, em nenhum doente se observou acidente isquémico transitório (AIT) mas num doente registou-se um episódio de AVC pelo que foi excluído do estudo.

Os enfartes localizaram-se na substância branca profunda em oito doentes (26,6%), sendo mais comuns no lobo frontal em seis (20%). No cerebelo encontraram-se enfartes em 2 doentes (6,6%), num dos quais estava associado a

atrofia, no outro doente o enfarte isquémico foi a única lesão detectada. A atrofia difusa verificou-se apenas em dois doentes (6,6%). Num doente localizava-se no cerebelo e no outro nos hemisférios frontais.

Neste estudo predominaram os enfartes de pequenas dimensões (<0,5cm). Em dois doentes verificaram-se enfartes de tamanho médio (0,5 a 1,5cm) e em apenas um doente se observou um grande enfarte localizado no cerebelo.

No Quadro XIV observam-se as alterações que foram detectadas na RMN-CE. As lesões de enfarte e atrofia predominaram no sexo masculino.

Quadro XIV. **Alterações detectadas por RMN-CE de acordo com o sexo**

Doentes (n=30)	RMN Total	RMN Normal	RMN alterada	Alterações detectadas por RMN-CE				
				Enfarte		Enfarte e Atrofia		Atrofia
				SBP	HC	SBP	HC	
Masculino	14	8	6	2	0	4	0	0
Feminino	16	10	6	2	1	0	1	2
Total	30	18	12	4	1	4	1	2
%	100	60	40	13,3	3,3	13,3	3,3	6,7

SBP= Substância branca profunda; HC= Hemisfério cerebeloso.

No estudo da RMN-CE foram encontradas outras alterações: umas são uma raridade (4%) (*de cavum do veli interpositi* e *cavum vergae*); outras consideradas achados sem interpretação (assimetria dos ventrículos laterais; quisto da fissura coroideia inferior a 1 cm; amígdalas cerebelosas diminuídas «limite normal»; ligeira ventriculomegalia tetra-ventricular; estenoses arteriais).

Nas Figuras de 16 a 20 inclui-se uma série de imagens demonstrativas de lesões de enfarte/isquémia e de atrofia, que num contexto geral reflectem a hipoxémia constante de maior ou menor grau em que vivem estes doentes.

A Figura 16 corresponde a um doente com haplotipo Bantu/Benin, HbF=1,7% com poucos EVO e com défice neuropsicológico acentuado.

Na Figura 17 observa-se uma imagem da extensa ventriculomegalia sem evidência de enfartes cerebrais que traduz uma hipoxémia mantida, num doente com o haplotipo Senegal e HbF=8%.

As Figuras 18 e 19 correspondem a uma doente com cefaleias persistentes localizadas na região frontal e com inúmeros EVO durante a sua evolução clínica, com haplotipo Bantu/Benin e HbF=0,7 e com deleção de um gene da α -talassémia.

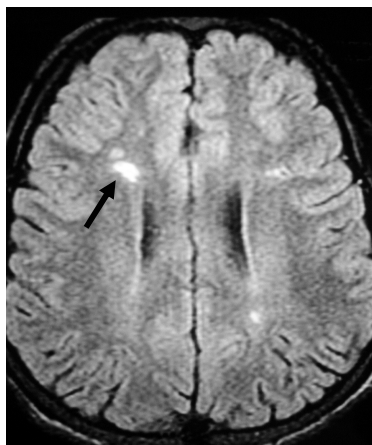


Figura 16. Enfartes isquêmicos bilaterais múltiplos na substância branca profunda com predomínio anterior num doente do sexo masculino com 19 anos de idade.

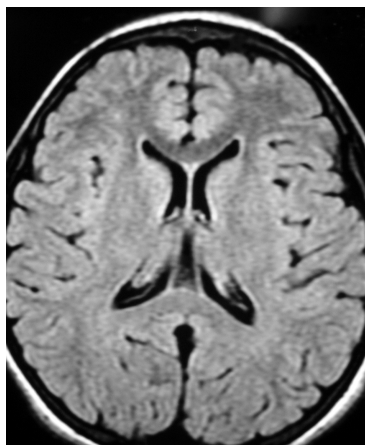


Figura 17. Atrofia cortical e sub-cortical traduzida por ventriculomegalia e acentuação dos sulcos corticais num doente do sexo feminino com 15 anos de idade.

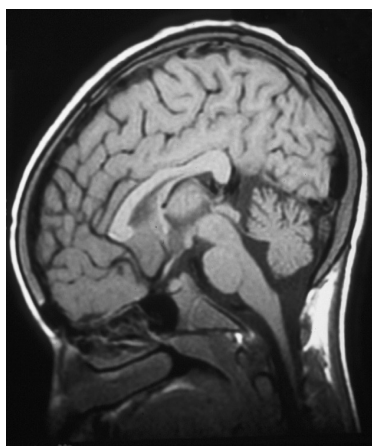


Figura 18. Corte sagital onde se observa atrofia cerebelosa, vermiciana e hemisférica sem enfartes silenciosos, numa doente com oito anos de idade.



Figura 19. Acentuada atrofia cerebelosa à esquerda na mesma doente mas em corte axial.

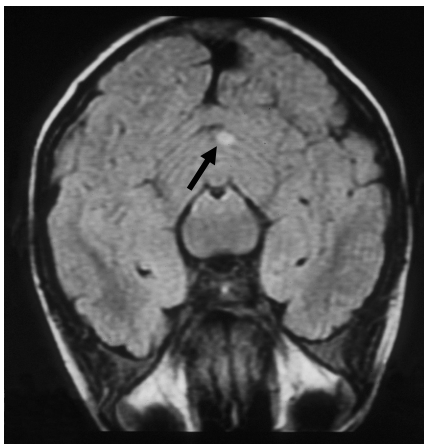


Figura 20. Enfarte médio no hemisfério cerebeloso paramediano à direita, sem aparente compromisso do andar supratentorial numa doente com 11 anos.

Estudo da relação entre os parâmetros seleccionados com a génese de enfartes silenciosos

Uma vez diagnosticados os ES através da RMN-CE, foram-se avaliar os indicadores de prognóstico que possam ter influenciado o seu aparecimento.

Idade

A média da idade dos doentes com ES e sem ES é respectivamente de 13,64 (11,78-15,49) e de 12,16 (10,49-13,83). Apesar da média de idades dos doentes com ES ser superior à dos doentes sem ES, a diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,278$).

Parâmetros genéticos

Quando se estudou a relação entre os parâmetros genéticos, nomeadamente os haplotipos e as deleções da α -talassémia e o aparecimento de ES, não se verificou significado estatístico ($p=0,327$ e $p=0,857$ respectivamente).

Parâmetros hematológicos

Em relação aos parâmetros hematológicos estudados, verificou-se que valores médios de HbF 8,6% (5,9-8,2) e número médio de leucócitos $12,39 \times 10^3/\mu\text{l}$ (10,45-14,33) se associaram respectivamente a ausência e presença de lesões cerebrais de isquemia, a que corresponde resultado estatisticamente significativo ($p=0,033$ e $p=0,041$).

Quanto aos restantes parâmetros hematológicos, usou-se a metodologia do Estudo 1. A média da Hb nos doentes sem ou com ES foram respectivamente de 8,4 g/dl (7,59-9,22) e de 7,7 g/dl (7,38-8,17). Em relação ao valor da bilirrubina total verificou-se uma tendência inversa; nos doentes sem ES os valores de bilirrubina total foram mais baixos 2,75 mg/dl (1,73-3,76) em comparação com os doentes com ES 3,62 mg/dl (2,75-4,49). Não se verificaram diferenças com significado estatístico na análise destes parâmetros ($p=0,148$ e $p=0,168$ respectivamente).

Parâmetros clínicos

Dos parâmetros clínicos estudados para se avaliar a possível relação com o aparecimento de ES, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas quanto ao número de EVO e ao número de STA nos doentes com e sem ES ($p=0,594$ e $p=0,767$).

Parâmetros sócio-económicos

Pelo estudo da relação dos parâmetros sócio-económicos avaliados segundo a escala de Graffar adaptada com o aparecimento de ES, também não se verificaram diferenças com significado estatístico ($p=0,224$) entre estas duas variáveis. No entanto verificou-se que os doentes com maior número de ES corresponderam a classes mais baixas, IV e V da referida escala.

Resultados do Doppler transcraniano

Os critérios adoptados neste estudo e referidos no capítulo da metodologia foram os de Adams em 1992 ⁽⁵⁾. Modificados ao fim de cinco anos de estudos, pelo mesmo

autor, considerando que valores ≥ 200 cm/segundo, na artéria carótica interna ou artéria cerebral média são um indicador mais rigoroso para avaliar o risco de AVC ⁽⁸⁾.

Em todos os doentes foram efectuados dois exames durante um período de um ano com um intervalo médio de 8,16 meses. Nos doentes que apresentaram alterações no DTC o intervalo entre os exames foi de 4 a 6 meses, mas no único doente em que se verificou um valor convencional de 196 cm/segundo a reavaliação foi mais precoce.

Dos 30 doentes que integraram o estudo, foram encontradas alterações em 4 (13,3%) dos doentes segundo os critérios de Adams ⁽⁵⁾. Em 26 doentes (86,7%) os DTC foram normais. Em três doentes o critério encontrado foi $ACA/ACM \geq 1,2$, não sendo relevante como critério isolado.

Na Figura 21 está representado o traçado do DTC correspondente a um dos doentes em que se observou apenas a razão entre a $ACA/ACM \geq 1,2$.

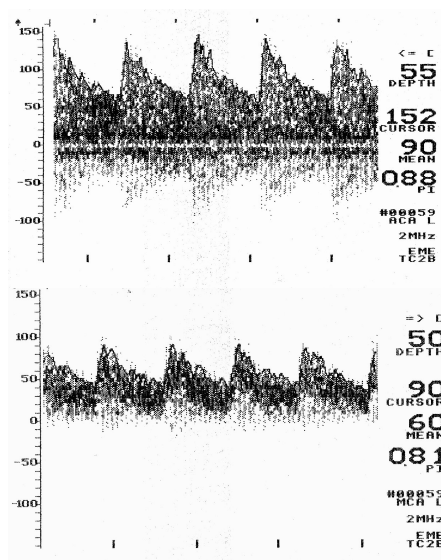


Figura 21. DTC: razão $ACA/ACM \geq 1,2$ num doente do sexo masculino assintomático.

O doente, em que também se documentaram alterações no DTC, apresentava o critério ACM à esquerda valor mais baixo/valor mais alto $\leq 0,5$ no primeiro exame; no

segundo exame feito com um intervalo de 4 meses, mostrava um segundo critério de Adams: $ACM > 196 \text{ cm/segundo}$, no mesmo vaso.

A Figura 22 mostra a imagem desse doente em que se observou uma aceleração convencional da ACM à esquerda, com um valor de velocidade média de fluxo de sangue de 196 cm/segundos registada a uma profundidade de 55 mm .

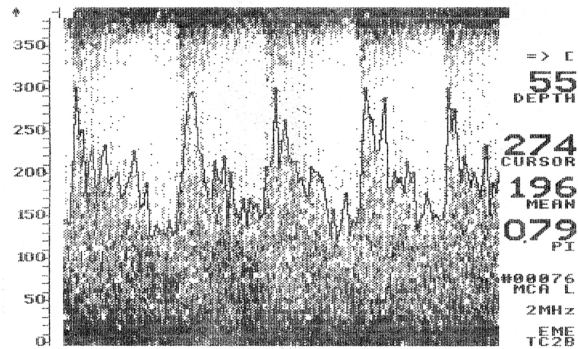


Figura 22. DTC: velocidade média de 196 cm/segundos na artéria cerebral média esquerda, num doente com 15 anos de idade.

Estas alterações traduzem o agravamento das lesões estenosantes naquele vaso num determinado segmento, pelo que se procedeu ao estudo imagiológico por RMN-CE e à angioRM – Figuras 23 e 24.

No estudo angiográfico dirigido ao polígono de Willis observaram-se sinais de vasculopatia grave, caracterizada por irregularidades e aspecto estenótico das porções supra-clinoideas dos sifões carotídeos em segmentos das artérias cerebrais médias e cerebrais anteriores, não se identificando sinais de lesões isquémicas nem trombooses dos seios venosos.

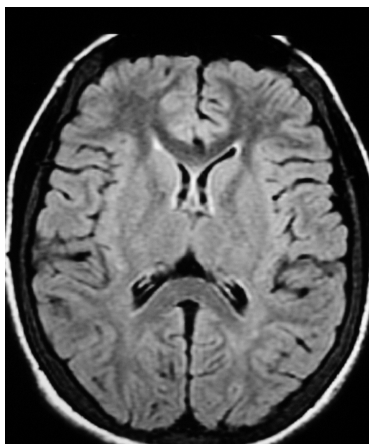


Figura 23. TCAR sem enfartes esquêmicos aparentes mas com sinais de marcada atrofia cortical difusa com predomínio anterior, num doente com 15 anos de idade.

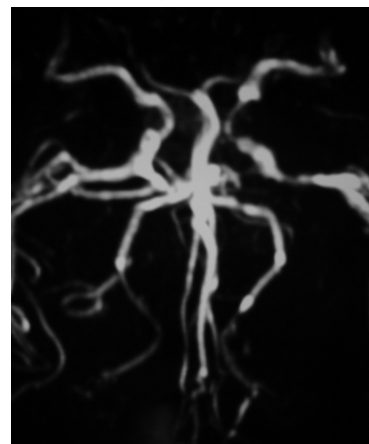


Figura 24. Imagem da angioRM do mesmo doente onde se observam estenose marcada e irregularidades das porções supra-clinoideais dos sífões carotídeos em segmentos das artérias cerebrais médias e cerebrais anteriores.

O quadro XV mostra os resultados do DTC nos quatro doentes deste estudo que apresentavam alterações segundo os critérios de Adams.

Quadro XV. **Classificação dos resultados do DTC segundo os critérios de Adams**

Doppler Transcraniano			
Exames		1º	2º
Normais		26	26
Critérios de Adams	Alterados		
	ACA / ACM > 1,2 cm/seg.	4	3
	ACM > 196 cm/seg.	0	1

Resultados dos testes psicológicos

Amostra populacional

Os doentes foram emparelhados de acordo com a variável **idade**, verificando-se que não existe significado estatístico ($p=0,174$) para o nível da escolaridade.

No GC as médias dos testes psicológicos nomeadamente Toulouse Piéron (TP) 16,06 (10,67-21,46), da Escala de Inteligência de Wechsler (QI) 93,35 (87,09-99,62), Matrizes progressivas de Raven 34,81 (31,28-38,33) e Bender 62,19 (59,60-68,78) em relação às médias dos doentes foram respectivamente 20,23 (12,16-28,29), 85 (77,82-92,18), 33,39 (29,36-37,42) e 59,35 (54,22-64,49) – Figura 25.

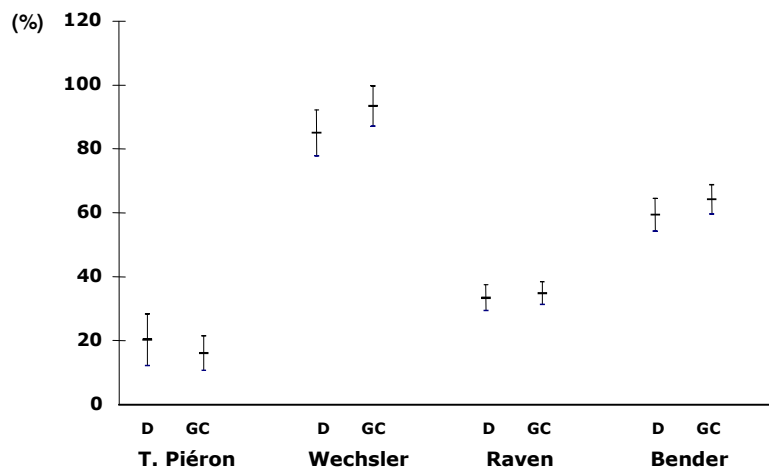


Figura 25. Comparação entre os testes psicológicos dos doentes e o GC.

D=doentes; GC=grupo de controlo; T. Piéron=Teste de Toulouse-Piéron; Escala de Inteligência Wechsler; Raven=Matrizes progressivas de Raven; Bender=Teste Gestáltico Visuomotor.

$p=0,05$

Observa-se que no GC os valores são ligeiramente mais elevados do que nos doentes, sem se verificarem diferenças com significado estatístico nos testes Raven e Bender (respectivamente $p=0,660$ e $p=0,165$); na escala de inteligência de Wechsler (QI) verificou-se que nos doentes os resultados são inferiores aos do GC, sem significado estatístico ($p=0,06$).

No entanto o teste TP que corresponde à atenção concentrada, o GC apresenta um intervalo interquartil menor do que os doentes e uma tendência para pontuações menores, o que corresponde a uma diminuição do défice de concentração ($p=0,420$). Também no teste de Bender o intervalo interquartil o GC apresenta valores mais elevados comparativamente aos doentes o que representa menor défice visuo-construtivo.

Em 17 doentes (56,7%) foram verificadas alterações em mais do que um teste psicológico e em 7 (23,3%) verificaram-se alterações apenas num teste. Em seis doentes (20%) todos os testes foram normais.

Quanto ao coeficiente de inteligência (QI) nos doentes a média foi de 85 e no GC de 94,3. Dos 30 doentes estudados, 23 (77%) evidenciaram testes alterados com uma pontuação média de 82. A percentagem de doentes com $QI < 70$ foi de 23,3% ($n=7$) versus 6,6% ($n=2$) no GC.

Na RMN-CE foram evidenciados enfartes silenciosos em 40% ($n=12$), não se verificando associação com as alterações encontradas nos testes psicológicos 27% ($n=8$), enquanto que em 33% ($n=10$) associaram-se a alterações nos mesmos testes.

Estudo da influência dos parâmetros seleccionados no neuro-desenvolvimento

Parâmetros genéticos:

Relativamente aos haplotipos o estudo do neurodesenvolvimento não evidenciou qualquer relação com significado estatístico (TP, Raven e Bender respectivamente $p=0,454$, $p=0,312$ e $p=0,679$). A deleção do gene da α -talassémia evidenciou alterações do teste de Wechsler (WISC-R e WAIS) com significado estatístico ($p=0,050$).

Parâmetros hematológicos:

Quanto à relação entre os parâmetros hematológicos alterados e o QI verificou-se entre valores mais baixos do VGM, CHGM e mais elevados de reticulócitos uma associação estatisticamente significativa ($p=0,04$ e $p=0,029$, $p=0,03$ respectivamente). A média do hematócrito de 24% (22,98-24,85) está relacionada com uma menor percentagem de doentes com alterações do coeficiente de inteligência ainda que sem significado estatístico ($p=0,08$).

Parâmetros clínicos:

Quanto aos parâmetros clínicos avaliados, o número de EVO e da STA não se associaram a alterações do neurodesenvolvimento com significativo estatístico ($p=0,594$ e $p=0,979$ respectivamente); mas em relação ao número de EVO todos os doentes com número ≥ 3 /ano apresentam em média pontuações inferiores nos testes psicológicos. Relativamente ao teste de Toulouse-Piéron relacionado com a atenção concentrada, as pontuações encontradas foram superiores, o que o evidencia como factor compensador de dificuldades intelectuais.

Parâmetros sócio-económicos:

A relação entre os parâmetros sócio-económicos como indicadores de prognóstico e os resultados dos testes psicológicos não evidenciou significado estatístico ($p=0,224$) apenas no teste de Wechsler ($p=0,027$); de um modo global, as crianças com melhor condição sócio-económica evidenciaram valores mais elevados neste teste.

Comparação das diferentes metodologias

Compararam-se os resultados da RMN-CE com os resultados dos DTC para determinar a relação entre os dois exames de neurodiagnóstico na identificação dos ES, não se tendo encontrado diferenças significativas ($p=0,327$); por outro lado, verificou-se que apenas 4 doentes apresentaram alterações no DTC e que destes, em dois (6,7%) as alterações foram comuns nos dois exames.

No quadro XVI descreve-se os resultados dos exames efectuados para o diagnóstico de lesão a nível do sistema nervoso central.

Quadro XVI. **Comparação entre os resultados do DTC e da RMN-CE**

		Doppler Transcraniano	
		Normal	Alterado
RMN-CE	Normal	14	2
	Alterado	12	2
Total		26	4

Atendendo a que não se verificou concordância entre os resultados do DTC e da RMN-CE, procedeu-se à verificação de concordância dos resultados dos testes psicológicos, que são mais sensíveis e específicos, como indicadores de patologia do sistema nervoso central.

O Quadro XVII resume a positividade dos resultados de diversos exames em doentes sem sintomatologia do sistema nervoso central, considerando cada metodologia separadamente ou em associação.

Quadro XVII. **Comparação dos resultados das metodologias utilizadas no estudo do SNC**

Metodologias	Doentes assintomáticos	
	Nº	(%)
RMN-CE	12	40
DTC	4	13,3
T. psicológicos	24	80
RMN-CE+T. psicológicos	9	30,0
DTC+T. psicológicos	4	13,3
RMN-CE+DTC	2	6,7
RMN-CE+DTC+T. psicológicos	1	3,3

Os testes psicológicos foram os que detectaram maior número de ES em 80% dos doentes, seguidos da RMN-CE em 40%. No entanto não se verificou concordância entre os resultados obtidos por estes testes ($p=0,856$).

Os resultados dos testes psicológicos relacionaram-se melhor com os resultados da RMN-CE do que com os resultados do DTC (respectivamente de 30% versus 13,3%). Apenas um doente (3,3%) apresentava em comum os três testes alterados.

ESTUDO 3

TERAPÊUTICA COM HIDROXIUREIA

De 1 de Setembro de 2001 a 1 de Setembro de 2003 (24 meses), um total de nove doentes, sete crianças e adolescentes (cinco do sexo feminino/dois de sexo masculino) foram elegíveis para o estudo da terapêutica com a HU.

Destes, dois doentes foram excluídos por não adesão à terapêutica, falta de comparência às consultas programadas e não cumprirem a prescrição médica.

As características individuais pré-tratamento e as complicações dos doentes com ACF estão discriminadas no Quadro XVIII.

Quadro XVIII. Características pré-tratamento dos doentes elegíveis para o estudo com HU

Doente (n=7)	Idade (anos)	Sexo	Origem geográfica	Genótipo	Haplotipo	Pré-HU (anos)	Complicações Pré-HU	Regime Transfusional
1	9	M	S. Tomé	SS/ α -Tal	Benin/Benin	8	6 EVO; 7 STA; 1 SS; 2 CA	-
2	11	M	Angola	SS	Bantu/Bantu	10	2 EVO; 3 STA; 2 SS	-
3	15	F	Angola	SS	Bantu/Bantu	10	6 EVO; 5 STA; 1 CA	-
4	12	F	S. Tomé	SS/ α -Tal	Bantu/Benin	6	9 EVO; 1 CA	-
5	13	F	Angola	SS	Bantu/Bantu	9	1 EVO; 5 STA	-
6	8	M	Angola	SS	Bantu/Bantu	6	3 EVO; 3 STA; 1 SS; 1 AVC	-21Ms a15Ms
7	14	F	Angola	SS/ α -Tal	Bantu/Bantu	12	2 EVO; 1 SS; 1 SDMO	-6 Ms a 6Ms

M=masculino; F=feminino; Ms=meses; A=anos; HU=hidroxiureia; EVO=episódio vaso-oclusivo; STA=síndrome torácica aguda; SS=sequestração esplénica; CA=crise aplástica; AVC=acidente vascular cerebral; SDMO=síndrome de disfunção multi-orgânica.

O tempo médio do seguimento clínico na Consulta de Imuno-Hematologia antes da entrada no estudo foi de 9 anos (6-12 anos). A média de idades no início do tratamento foi de 12 anos (8-15 anos). Todos os doentes eram de origem africana, cinco de Angola e dois de S. Tomé.

Cinco doentes tinham haplotipo Bantu/Bantu, um Bantu/Benin e outro Benin/Benin. Três eram portadores em simultâneo de uma deleção para o gene α -talassémia ($-\alpha^{-3.7}/\alpha\alpha$).

Todos os doentes elegíveis para o estudo apresentavam manifestações clínicas de gravidade: EVO ≥ 3 /ano, STA ≥ 2 /ano, AVC e SDMO. No total houve 29 EVO, 24 STA, 5 sequestrações esplénicas (SS), 4 crises aplásticas (CA), 1 AVC e 1 SDMO.

Salientam-se a seguir alguns aspectos mais relevantes da série estudada.

Os doentes 6 e 7 tinham um quadro clínico particularmente grave, ambos com haplotipo Bantu, necessitando de regime transfusional, ainda que por diferentes situações.

O primeiro, um doente do sexo masculino com oito anos de idade com um AVC isquémico aos seis anos diagnosticado por RMN-CE entrou em regime transfusional regular. Teve uma má evolução clínica desde o primeiro ano de vida, aos nove meses, surgindo síndrome *hand-foot* seguido por várias crises de sequestração, de EVO e STA durante toda a evolução clínica.

O segundo, uma doente do sexo feminino com 12 anos de idade sem EVO no domicílio adoece subitamente com SDMO na sequência de um quadro de sépsis a *salmonella enteritidis*, com osteomielite generalizada dos membros. Apesar da gravidade desta situação, houve recuperação total com normalização dos parâmetros clínicos e laboratoriais. Importante assinalar que aos nove meses de idade teve uma osteomielite também a *salmonella enteritidis*, não tendo feito terapêutica profiláctica; aos sete anos foi colecistectomizada.

O doente 6 iniciou HU após 21 meses de RTR mantendo as duas terapêuticas até ao fim do estudo; a doente 7 iniciou HU após seis meses de RTR por reacção alérgica à terapêutica quelante com desferroxamina B tendo feito as duas terapêuticas em simultâneo durante seis meses. Após este período, desenvolveu-se uma úlcera da perna que curou oito meses depois.

Considerando o enviesamento esperado, os valores hematológicos e bioquímicos destes dois doentes foram avaliados em separado.

Todos os doentes completaram pelo menos 15 meses de terapêutica com HU (média 19 ± 4 meses), com uma dose final média de 20 ± 4 mg/Kg/dia.

Resposta Clínica

Os parâmetros da resposta clínica são apresentados na Figura 26. O número de EVO por ano diminuiu 80%, de $0,5 \pm 0,5$ (mediana 0,4) antes do início da terapêutica com HU para $0,1 \pm 0,2$ (mediana 0,0) durante a terapêutica com HU ($p=0,047$). Apenas o doente 1 teve um EVO no início do tratamento.

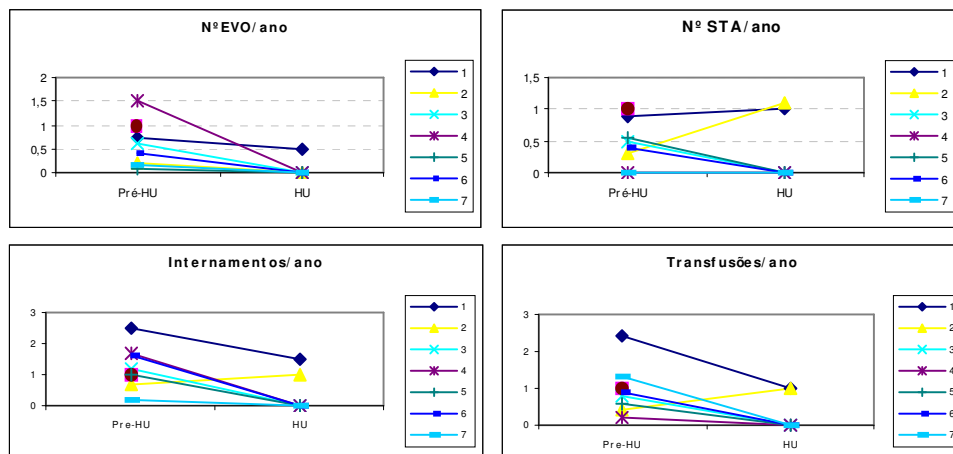


Figura 26. Resposta clínica à terapêutica com HU.

Nº de internamentos e duração dos mesmos. Nº de transfusões Pré HU=antes do início da hidroxiureia; HU=durante a terapêutica com hidroxiureia.

O número de STA por ano diminuiu 25%, de $0,4 \pm 0,3$ (mediana 0,4) antes do início da HU para $0,3 \pm 0,5$ (mediana 0,0) durante a terapêutica com HU ($p=0,681$). Nos doentes 1 e 3, durante a terapêutica com HU, verificaram-se dois episódios da STA em cada; sendo importante referir que antes do início da terapêutica no doente 1 verificou-se maior número da STA e no doente 3 registaram-se antecedentes de asma.

Observou-se uma redução de 69% no número de admissões hospitalares por ano, de uma média de $1,3 \pm 0,7$ (mediana 1,2) antes do início de HU versus $0,4 \pm 0,6$ (mediana 0,0) durante a terapêutica com HU ($p=0,016$). Não foram considerados os internamentos programados nos doentes em RTR. Dos restantes apenas dois doentes (29%) com STA foram internados durante o período de estudo.

A média do número de dias de internamento por ano diminuiu 76%, de $11,9 \pm 7,3$ (mediana 10,6) antes da terapêutica para $2,8 \pm 5,2$ (mediana 0,0) durante a terapêutica com HU ($p=0,005$). Em todos, excepto no doente 3, se verificou redução na duração do período de internamento.

Globalmente, o número de transfusões por ano diminuiu 67%, de uma média de $0,9 \pm 0,7$ (mediana 0,8) antes do início da HU para $0,3 \pm 0,5$ (mediana 0,0) durante a terapêutica com HU ($p=0,045$). Em todos os doentes, houve uma redução nas necessidades transfusionais.

Resposta hematológica

Considerou-se a média dos valores hematológicos no início (pré-HU) e após 15 meses de terapêutica com HU como se observa no Quadro XIX.

Quadro XIX. **Resposta dos parâmetros hematológicos à terapêutica com HU**

Parâmetros hematológicos	Pré-HU	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	p
Hb (g/dl)	$8,1 \pm 0,8$	$8,2 \pm 1,2$	$8,1 \pm 1,6$	$8,0 \pm 1,3$	$8,0 \pm 1,0$	$8,0 \pm 0,9$	0,262
Hb F (%)	$7,0 \pm 4,0$	$13,2 \pm 3,7$	$11,6 \pm 8,1$	$12,1 \pm 6,9$	$12,4 \pm 5,9$	$13,7 \pm 5,3$	0,028
VGM (fl)	$88,1 \pm 8,7$	$101,9 \pm 9,7$	$92,4 \pm 15,9$	$95,8 \pm 10,8$	$98,0 \pm 13,9$	$98,1 \pm 12,8$	0,094
HGM (g/dl)	$29,6 \pm 4,9$	$35,2 \pm 3,2$	$31,5 \pm 5,9$	$33,5 \pm 4,8$	$34,1 \pm 5,7$	$33,6 \pm 4,4$	0,097
Reticulócitos ($\times 10^9/\mu\text{l}$)	351 ± 97	273 ± 134	288 ± 119	264 ± 113	296 ± 154	343 ± 135	0,894
Neutrófilos ($\times 10^9/\mu\text{l}$)	$5,4 \pm 2,5$	$4,1 \pm 1,0$	$4,4 \pm 2,1$	$3,8 \pm 1,2$	$5,2 \pm 1,2$	$4,4 \pm 2,1$	0,430
Plaquetas ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	539 ± 147	510 ± 115	558 ± 182	508 ± 120	495 ± 143	546 ± 180	0,783

Hb=hemoglobina total; HbF=hemoglobina fetal; VGM=volume globular médio; HGM=hemoglobina globular média; Reticulócitos=contagem absoluta de reticulócitos ; Neutrófilos=contagem absoluta de neutrófilos; M=meses.

* $P=0,05$

O nível médio inicial de HbF aumentou de $7,0 \pm 4,0\%$ (mediana 6,6) para $13,7 \pm 5,3\%$ (mediana 14,5) após 15 meses de HU ($p=0,028$). Nos doentes em RTR,

também se registou um aumento no valor da HbF, $0,7 \pm 3,2\%$ e $0,5 \pm 7,5\%$ respectivamente.

Verificou-se um aumento não significativo dos valores médios de VGM e HGM após 6 meses de terapêutica com HU o qual se manteve durante todo o estudo ($p=0,094$ e $p=0,097$ respectivamente).

Não se verificaram aumento no valor médio da Hb total com significado estatístico ($p=0,262$), nem alterações significativas no número de reticulócitos, neutrófilos e plaquetas ($p=0,894$; $p=0,430$ e $p=0,783$ respectivamente).

Dos parâmetros hematológicos registados no Quadro XIX não constam os doentes que se encontram em regime transfusional.

A Figura 27 mostra a evolução dos parâmetros hematológicos durante o estudo, podendo observar-se que o aumento da HbF foi paralelo à diminuição da HbS, em todos os doentes.

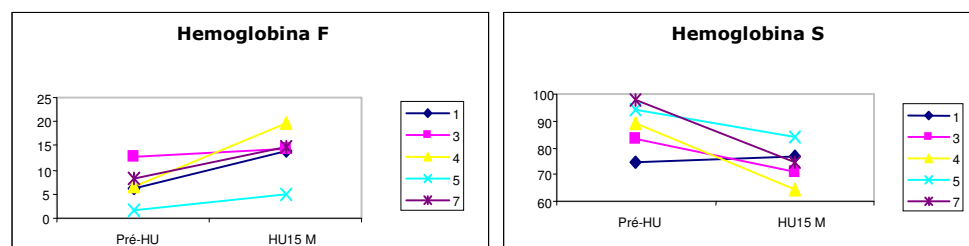


Figura 27. Resposta dos parâmetros hematológicos à terapêutica com HU. Pré HU - antes de se iniciar a terapêutica com hidroxiureia; HU - durante a terapêutica com hidroxiureia

Resposta bioquímica

Com o tratamento com a HU verificou-se que a bilirrubina total diminuiu de $3,2 \pm 1,4$ versus $1,8 \pm 0,7$ com significado estatístico ($p=0,05$). Os restantes parâmetros bioquímicos mostram oscilações pequenas e sem significado estatístico durante o tratamento com HU - Quadro XX.

Quadro XX. **Parâmetros bioquímicos antes e durante a terapêutica com HU**

Parâmetros Bioquímicos	Pré-HU	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	p*
*BT (mg/dl)	3,2 ± 1,4	2,4 ± 1,0	1,8 ± 0,6	2,1 ± 1,0	1,7 ± 0,7	1,8 ± 0,7	0,050
*LDH (mg/dl)	1,270 ± 497	1,277 ± 550	1,184 ± 379	1,161 ± 88	980 ± 112	1,126 ± 400	0,286
Ureia (mg/dl)	23 ± 12	17 ± 7	19 ± 8	20 ± 6	16 ± 4	20 ± 4	0,667
Creatinina (mg/dl)	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,707
GOT (UI/l)	35 ± 13	36 ± 10	39 ± 7	42 ± 10	35 ± 11	38 ± 17	0,345
GGT (UI/l)	23 ± 11	25 ± 11	24 ± 10	26 ± 16	25 ± 16	24 ± 22	0,582

BT=bilirrubina total; LDH=desidrogenase láctica; GOT=alanina transaminase; GGT=aspartato transaminase.
 *Todos os doentes excepto os dois que entraram em regime transfusional. Comparação dos valores Pré-HU e após 15 meses de terapêutica com HU.

*p= 0,05

Toxicidade

Globalmente, não se verificaram alterações com significado estatístico quanto aos valores médios das três séries hematológicas e à função hepática e/ou renal antes e após terapêutica com HU. O doente 4, em apenas uma determinação e durante um mês, evidenciou valores de reticulócitos inferiores a 125.000/mm³ e de neutrófilos inferiores a 2.000/mm³ no contexto de infecção vírica com ulterior evolução para a normalidade não obrigando a diminuir a dose anteriormente prescrita da HU.

Discussão

DA IMPORTÂNCIA DO TEMA.....	109
DOS PROBLEMAS INERENTES À POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	110
DOS RESULTADOS GLOBAIS.....	111
Caracterização dos doentes.....	111
DOS RESULTADOS DOS ESTUDOS 1, 2 e 3.....	117
ESTUDO 1.....	117
SISTEMA CARDIO-RESPIRATÓRIO.....	117
Avaliação funcional respiratória.....	117
Influência dos parâmetros seleccionados na função pulmonar.....	120
Radiografia do tórax.....	122
Tomografia computadorizada de alta resolução no diagnóstico da lesão pulmonar.....	123
Avaliação cardiovascular.....	123
ESTUDO 2.....	126
SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	126
A importância da imagiologia.....	126
Avaliação do neurodesenvolvimento.....	131
Comparação entre os diferentes métodos de avaliação da disfunção cerebral.....	133
ESTUDO 3.....	136
TERAPÊUTICA COM HIDROXIUREIA.....	136

DA IMPORTÂNCIA DO TEMA

A ACF, doença hereditária autossómica recessiva, caracterizada por dor severa e lesão multi-orgânica constantes nesta doença, constitui um desafio para todos os que lidam com esta patologia.

Desde a primeira descrição, em 1910, quase um século passou e muito se progrediu no conhecimento da sua história natural.

Por sua vez, o avanço da tecnologia, principalmente nos últimos 30 anos, permitiu o melhor conhecimento das complicações, a instituição de novas e melhores perspectivas terapêuticas.

Mas a variabilidade da expressão clínica da ACF é uma constante realidade e um problema a resolver com que se debate actualmente o mundo da investigação, para o qual o conhecimento de indicadores de prognóstico responsáveis pelos diferentes aspectos da diversidade da evolução clínica será de extrema importância.

A intensa actividade assistencial num serviço de Imuno-Hematologia, onde diariamente tive a oportunidade de contactar com crianças e adolescentes com ACF, constituiu o incentivo para a realização deste estudo, convicta de poder contribuir para a melhor qualidade de vida destes doentes.

A ACF em Portugal tem sido documentada em raros estudos parcelares, sem que se tenha elaborado até à data um estudo que englobe as suas principais complicações na idade pediátrica e o tratamento das formas mais graves neste grupo etário.

Pelas peculiaridades genéticas, físico-químicas, fisiopatológicas entre outras, e às quais se acrescentam culturais, socio-económicas e governamentais, a ACF apresenta-se com uma tão grande diversidade clínica que constitui um grande desafio quer para os clínicos quer para os investigadores.

Só a correcta integração de conhecimentos obtidos por estudos genéticos, clínicos, imunológicos, epidemiológicos e outros poderá, permitir que se conheça na íntegra esta patologia.

A investigação de indicadores de prognóstico que modulam as hemoglobinopatias, numa fase em que se aguarda uma terapêutica ideal para uma doença até à data sem cura, constitui seguramente a melhor abordagem duma patologia que abrange milhões de pessoas em todo o mundo.

A possibilidade de se dispor de novas terapêuticas, ainda em investigação constitui uma esperança para uma melhor qualidade de vida e maior longevidade. A hidroxiureia é de todas, sem dúvida, a terapêutica com melhores resultados e com menor toxicidade.

DOS PROBLEMAS INERENTES À POPULAÇÃO EM ESTUDO

Os doentes portadores de uma doença crónica e hereditária como a ACF são dominados durante toda a vida por uma dor, ligeira ou severa, mas que interfere sempre com a rotina diária familiar, escolar, profissional e mesmo social.

E interfere como? Vários internamentos de tempo imprevisível por episódios dolorosos, processos infecciosos agudos graves, lesões orgânicas variadas mas, sempre pondo em risco a vida dos doentes. Por estes estarem longe das suas raízes

de origem constituem minorias étnicas com problemas de integração e adaptação a todos os níveis.

Assim foi muito complexa a tarefa de conseguir a colaboração com o calendário de consultas, exames programados em diferentes instituições e no cumprimento de terapêuticas profiláticas e sintomáticas.

Com esforço e grande perseverança de uma muito dedicada equipa, apoiando quem deseja investigar, foram obtidos os resultados discutidos nesta dissertação na perspectiva do dever ético de prestar um serviço à comunidade e no pressuposto de que a investigação pode contribuir decisivamente para a melhoria da qualidade assistencial.

DOS RESULTADOS GLOBAIS

Caracterização dos doentes

Em todos os estudos integrantes deste projecto de investigação, não se observaram diferenças entre os dois sexos, apesar dos doentes do sexo masculino terem idades superiores aos do sexo feminino. A idade é um factor muito importante para a evolução das complicações na história natural da ACF. Porém, no grupo em análise a idade não teve significado estatístico em todos os estudos parcelares desta investigação. Admite-se ser consequência do período limitado de tempo do estudo.

Para a escolha da amostra eliminaram-se do estudo os doentes com idade inferior a seis anos o que foi determinado dada a falta de colaboração desse grupo etário, na execução das provas da função respiratória e por ser necessário para a RMN-CE a utilização de meios de contraste com eventual risco de complicações pulmonares secundárias à técnica.

A amostra populacional é muito heterogénea, constituída por doentes com diferentes origens; apenas um doente (0,1%) é de origem caucasiana, natural da Comporta, Portugal, onde grassavam os arrozais e em simultâneo a malária, condições estas propícias ao desenvolvimento e propagação da doença. De realçar que ainda que em pequeno número, estão representadas quase todas as ex-colónias portuguesas.

Estes doentes fazem parte das minorias étnicas; 62,5% correspondem à classe IV e V da escala de Graffar vivem em más condições de vida, sujeitos a piores condições climáticas, factores condicionantes de maior número de EVO e de uma pior evolução clínica ⁽³⁶⁹⁾. A melhor qualidade nos cuidados primários de saúde que encontraram em Portugal condicionou favoravelmente a qualidade de vida dos doentes.

Dada a grande importância dos factores ambientais na evolução da ACF estes seriam um parâmetro a considerar no estudo dos indicadores de prognóstico. No entanto, não foi possível o seu estudo dado o carácter subjectivo que os envolve e a dificuldade de se dispor de meios científicos precisos para os avaliar. Este aspecto pode, de facto, considerar-se uma limitação do estudo.

A variabilidade da expressão clínica da ACF influenciada pelos factores sócio-económicos é determinada pelos haplotipos e modificada pela presença da α -talassémia; verifica-se, pois, uma interacção destes factores. No entanto, na fase aguda da doença, os haplotipos e a α -talassémia não têm repercussão nas manifestações clínicas ⁽²⁶⁸⁾.

Neste estudo, a igualdade de prevalência entre o haplotipo Bantu (53%) e os restantes haplotipos com diferentes combinações dificultou a avaliação deste parâmetro como indicador de prognóstico, o que pode estar relacionado com a existência de outros factores epistáticos (que não foram objectivo deste estudo) e/ou com o tamanho da amostra.

A diversidade de haplotipos que foi encontrada explica-se, em parte, pela posição estratégica de Portugal no mundo, pelo espírito de aventura dos portugueses, pela coexistência de áreas de *P. falciparum* nos arrozais a sul do rio Tejo e, nos últimos anos, pelos fenómenos de migração.

O aparecimento de dois novos haplotipos atípicos ⁽⁵⁰⁶⁾ em doentes naturais de Cabo Verde expressa o que se acaba de referir. Assim, a associação muito rara do haplotipo I de Orkin ao gene β^S aqui reportada, implica que tenha havido uma recombinação no agrupamento génico da β^S -globina, entre um agrupamento de haplotipo Benin e outro de haplotipo I.

Esta recombinação pode ser explicada pelo facto de a população de Cabo Verde ser muito miscigenada (Portugueses, Guineenses, Angolanos e outros). O facto de ocorrer em homozigotia pode significar consanguinidade na família, o que não se verificou, ou

que este haplotipo recombinante seja relativamente frequente nesta população, hipótese mais provável ⁽²²⁴⁾.

A co-hereditariedade da α -talassémia com a ACF tem efeitos específicos nos parâmetros hematológicos mas apresenta manifestações clínicas variáveis ^(108, 174, 268, 420). A α -talassémia na ACF relaciona-se com a persistência da esplenomegalia, sinal de benignidade da doença, diminuição da hemólise por diminuição da CHGM e melhoria das propriedades reológicas dos eritrócitos falciformes ⁽³⁸⁹⁾. Relativamente à deleção do gene α -globina nesta população verificou-se a seguinte distribuição: 46,9% com ou sem uma deleção e 6,2 % com homozigotia. De referir que não se verificou repercussão clínica das deleções da α -talassémia, tal como referido por Montalembert num trabalho realizado com uma amostra populacional semelhante à deste estudo ⁽²⁶⁸⁾.

Apenas na deleção de dois genes da α -talassémia se observou o efeito protector da α -talassémia: dois doentes com haplotipos Bantu e valores muito baixos de HbF (1,5% e 2,7%) apresentaram boa evolução clínica, sem registo de outros parâmetros adicionais de bom prognóstico, clínico ou hematológico.

A HbF considerada até agora o inibidor mais importante da polimerização da desoxi-hemoglobina, influencia a gravidade clínica da ACF, resulta da combinação de duas cadeias γ diferentes: as cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ que são produtos de genes não alélicos no agrupamento génico da β -globina. Na sua determinação verificou-se uma excelente correlação dos resultados pela desnaturação alcalina e HPLC nos níveis de HbF entre 1 a 10%. Com níveis mais elevados da HbF, a desnaturação alcalina é menos precisa e condiciona valores mais baixos do que com HPLC.

A sua importância deve-se teoricamente a três factores: o aumento da HbF intra-eritrocitária diminui a percentagem da HbS e, conseqüentemente, a formação de polímeros de HbS e a polimerização; em segundo lugar a HbF não co-polimeriza com a HbS, aumentando portanto a solubilidade intracelular da HbS; finalmente, quanto maior a quantidade de HbF nos eritrócitos falciformes, maior a possibilidade de inclusão de cadeias γ nos tetrâmeros de Hb e por sua vez estes tetâmeros híbridos da Hb atrasam a polimerização podendo ser completamente excluídos dos polímeros da HbS ^(31, 246).

O declínio fisiológico da HbF relaciona-se com uma maior morbidade e mortalidade. Inicia-se antes do nascimento, quando a expressão do gene da β -globina

começa a substituir a expressão do gene γ -globina durante os últimos dois meses de gestação. Esta comutação genética é de 20% ao nascer e continua no período pos-natal. Ao ano de idade, a percentagem da HbF nas crianças normais é igual à percentagem do adulto, aproximadamente de 1% ^(106, 248, 389, 462).

Nos doentes com ACF verifica-se um atraso na comutação genética e os níveis de HbF persistem até valores de 20 a 25% muitas vezes até aos cinco anos de idade, segundo estudos do CSSCD nos EUA e CS da Jamaica ^(31, 342, 345, 389).

Existe uma relação entre os valores da HbF e o fenotipo clínico ^(31, 225), verificando-se que um valor entre 10 a 20% melhora as complicações clínicas dos doentes ^(245, 248, 343).

Nos parâmetros hematológicos estudados, a HbF foi constante revelando-se sempre como um indicador de bom prognóstico, ainda que os seus valores tenham variado de indivíduo para indivíduo. Segundo a pesquisa efectuada a relação entre os valores de HbF e os haplotipos indica que os doentes com haplotipo Senegal se associam a valores mais elevados de HbF, o que justifica a melhor evolução destes doentes em relação aos que são portadores do haplotipo Bantu ^(131, 290, 293, 347). Neste estudo o haplotipo Senegal na forma homozigótica observou-se em três doentes, dois dos quais com boa evolução clínica e o terceiro doente com uma evolução menos favorável devido ao facto de ser portador em simultâneo de défice de glucose-6--fosfato-desidrogenase ⁽³³⁷⁾.

A Figura 5 apresenta a relação entre a HbF e os parâmetros genéticos. Os valores mais elevados de HbF relacionam-se com o haplotipo Senegal, os valores intermédios com o haplotipo Benin e os mais baixos com o haplotipo Bantu. Estes resultados de acordo com os dados obtidos noutros estudos, demonstram a modulação genética dos haplotipos nos valores da HbF ^(106, 291, 313).

Na Figura 6 observa-se como a relação da HbF, com a percentagem da G_γ , teve significado estatístico ($p=0,047$). Aos valores de HbF elevados correspondem a razão das cadeias $G_\gamma/A_\gamma > 1$ (>50), ou seja, padrão do recém-nascido em que persistem valores elevados de HbF e portanto melhor evolução da doença ^(113, 287).

Por último, na Figura 7 não se verificou resultados com significado estatístico entre os valores da HbF e o número de EVO. Observaram-se dois *outliers* que correspondem

a doentes em que os factores ambientais e as más condições sócio-económicas foram os factores desencadeantes de EVO, apesar dos valores elevados de HbF.

O fenotipo clínico dos doentes até à data da realização do estudo observou-se que: dos parâmetros estudados, os EVO representam a complicação mais frequente da ACF verificando-se em 87,5% dos doentes. As STA representam a segunda grande complicação (59,38%), surgem logo na primeira década de vida, em 57,9% dos doentes com uma evolução desfavorável com necessidade de transfusão. As sequestrações ocorreram em três doentes e num deles por três vezes. Neste doente (3,12%) observou-se um quadro grave de sépsis a *Pseudomonas*, provavelmente relacionado com o défice imunológico frequente nestes doentes ^(43, 59, 79, 239, 273).

Dos doentes com dactilite, sete (21,8%) surgiram no primeiro ano de vida e destas apenas em dois doentes foram preditivas de má evolução. Dos restantes, num doente com dactilite surgida aos 18 meses de idade observou-se maior número de STA, o que se atribui ao facto de a dactilite ser considerada um factor de risco quando surge no primeiro ano de idade⁽³⁸⁶⁾.

Dos dois casos de osteomielite, um deles com osteomielite nos ossos do pé aos 11 meses de idade veio a ter sépsis por *Salmonella enteritidis* aos nove anos de idade com um quadro de lesão multi-orgânica pondo em risco a vida do doente. No outro caso a osteomielite localizada junto à articulação escapulo-humeral, teve boa evolução.

Nas duas complicações acima referidas, sépsis e osteomielite por *Salmonella enteritidis*, os doentes devem de ser submetidos a profilaxia com terapêutica antimicrobiana durante o resto da vida.

O único caso de priapismo teve evolução favorável e ocorreu num doente de cinco anos de idade, caucasiano, com a pior evolução clínica, constituindo provavel-mente um indicador de mau prognóstico.

A litíase vesicular foi mais frequente na segunda década de vida e foi encontrada em metade dos doentes. As crises hiper-hemolíticas ocorreram em 16 doentes; em seis foram devidas a crises de paludismo pelo *P. falciparum* (40%) e, nas restantes crises, a infecções de várias etiologias.

Em relação aos parâmetros hematológicos a Hb apresenta um valor médio de Hb 8,1 g/dl com limites entre 5,8 e 10,7 g/dl. Este resultado está de acordo com um estudo feito na população da Jamaica ⁽⁴¹⁵⁾. Na fase estável da doença valor elevado de Hb é factor de risco para os EVO e STA, tal como se observou neste estudo em que 12/14 dos doentes (85,7 %) com Hb $\geq 8,1$ g/dl evidenciaram EVO ≥ 3 por ano e 9/14 dos doentes (64,3%) STA ≥ 1 por ano.

Na ACF a diminuição da concentração de Hb associada a valor de reticulócitos elevados (factor de risco quando superior a 25%) e bilirrubina elevada indicam a presença de um quadro de hemólise ^(385, 469, 491). Neste estudo 13/32 dos doentes (40,6%) evidenciaram valores de reticulócitos $\geq 13 \times 10^3/\mu\text{l}$ e 8/13 dos doentes (61,5%) apresentaram em simultâneo valores de Hb $\leq 8,1$ g/dl e de bilirrubina total $\geq 2,5$ mg/dl, respectivamente, donde se infere que mais de 50% dos doentes apresentam hemólise ⁽³²⁾.

A contagem do número de plaquetas no estado basal da doença não se relaciona com o número de complicações da ACF ⁽³¹¹⁾, tal como se verificou neste estudo, em que se observou o valor médio de plaquetas de $440 \times 10^3/\mu\text{l}$.

Ainda que se verifique uma melhoria aparente em relação às complicações da doença durante o tempo de estudo, é difícil fazer-se uma comparação com o período anterior. Esta, como foi dito, não constitui objectivo do mesmo, dada a disparidade dos períodos de tempo em que se fez o registo de dados, a idade dos doentes e as diferentes situações vividas pelos mesmos.

DOS RESULTADOS DOS ESTUDOS 1, 2 e 3

ESTUDO 1

Sistema cardio-respiratório

Avaliação funcional respiratória

A identificação de doentes com doença pulmonar progressiva, numa fase ainda precoce, através das provas da função pulmonar é um imperativo, porque nos estádios finais da doença pulmonar os tratamentos, mesmo os mais agressivos, têm escasso benefício.

A AFR é um importante meio de diagnóstico para o estudo dos doentes que tenham ou que se suspeite de doença pulmonar ou da existência de factores de risco para o pulmão. O estudo dos gases no sangue arterial faz parte integrante da AFR.

Com a finalidade de se conhecer a existência de lesão pulmonar e de se caracterizar o respectivo padrão encontrado, procedeu-se em todos os doentes ao estudo da função pulmonar em simultâneo com o estudo dos gases no sangue. Usou-se um GC emparelhado para a mesma idade, sexo, e origem geográfica, relacionando-se os resultados deste grupo e os das crianças com ACF com os mesmos valores de referência.

Neste estudo, e reportando-nos ao Quadro XI, os resultados das provas da função pulmonar e os dados biométricos dos doentes com doença diferem dos do GC, quanto ao peso e aos valores da Hb média. As diferenças encontradas no peso dos doentes, revelando deficiente evolução ponderal, podem ser explicadas pela repercussão metabólica relacionada com o aumento da eritropoiese ⁽²⁴²⁾.

A comparação da AFR entre o grupo de controlo e os doentes com ACF mostra que os doentes têm valores inferiores na média da TLC, FEV1 e DLco, mas similares FEV1/FVC - Figura 8. Estes resultados sobrepõem-se aos de Sylvester *et al.* ⁽⁴³⁶⁾ feito em doentes com idades compreendidas entre os cinco e 17 anos, mas apresentava valores inferiores aos da série de Pianosi *et al.* ⁽³³¹⁾ em que os doentes eram mais velhos do que os incluídos neste estudo; tal achado parece demonstrar a importância da idade na deterioração da função pulmonar.

Na primeira avaliação, contudo, foram poucas as crianças com ACF (3,3%) em que os TFP estavam alterados de modo a serem classificados em doença restritiva pulmonar e essas alterações restritivas foram ligeiras, uma vez que os valores pouco diferiam dos valores normais.

Apenas num doente com atraso estatura-ponderal, com o peso e altura de um desvio padrão abaixo do percentil 5, verificou-se volume pulmonar diminuído (TLC_{He} de 59,61% do valor previsto) com alteração da difusão (41% do valor previsto) mas com $SatO_2$ normal^(183, 210, 233, 302, 329, 441).

Comparando a 1ª com a 2ª avaliação, verificou-se uma diminuição significativa dos volumes pulmonares ($p < 0,05$). As alterações restritivas encontradas em 36,6% dos doentes na 1ª avaliação passaram para 70% dos doentes na 2ª avaliação, assim como o grau de gravidade passou de ligeiro (TLC 70% do valor previsto) a moderado (TLC 60% do valor previsto). É lícito, pois, referir que foi progressiva a redução dos volumes pulmonares.

Inferre-se, assim, a importância da diminuição do volume pulmonar no conjunto dos restantes parâmetros por permitir caracterizar a lesão pulmonar e, assim definir o padrão restritivo que predomina nestes doentes.

A diminuição da DL_{CO} da membrana alveolar, ainda que sem diferenças significativas ($p = 0,611$) da 1ª versus 2ª avaliação também não tem significado clínico, dado que os valores são inferiores aos valores normais em apenas 36,6% dos doentes. Além de que, nos doentes com ACF há um aumento constante do volume do território vascular pulmonar, que permite uma difusão alveolar adequada e deste modo uma suficiente oxigenação tecidual^(207, 210, 343).

Os resultados deste estudo são sobreponíveis aos encontrados por outros autores. De acordo com Femi-Pearse *et al.*,⁽¹²⁵⁾ a DL_{CO} está diminuída nos doentes com ACF; segundo Miller e Serjeant *et al.*,^(260, 262) os resultados são atribuídos à diminuição da difusão da membrana por complicações pulmonares anteriores. A razão da discrepância entre estes estudos poderá estar relacionada com o tempo de evolução da doença, tal como provavelmente aconteceu neste trabalho.

A pressão arterial de O_2 em repouso nos doentes assintomáticos com ACF situa-se tipicamente entre 74 a 90 mmHg sem haver retenção do dióxido de carbono⁽³⁴³⁾. Nos doentes deste estudo o valor médio foi de 86% sem significado estatístico nem clínico,

dado que as saturações de oxigénio sempre estiveram normais ou mesmo aumentadas e não se verificaram alterações das trocas de oxigénio.

Os valores aumentados dos gases no sangue com significado estatístico para a SatO_2 ($p=0,002$) não evidenciaram significado clínico, uma vez que na ACF valores de 92% de SatO_2 são considerados normais⁽⁸⁹⁾, tendo em conta que os valores da SatO_2 medidos nos aparelhos automáticos são calculados com base na PaO_2 assumindo o Percentil 50 (P_{50}). Tal noção não é válida para os doentes com ACF porque a PaO_2 é mais elevada no P_{50} ; daí os resultados da SatO_2 serem também falsamente mais elevados^(142, 207).

No entanto, o desenvolvimento da hipoxémia na DPC pode ser insidioso, pelo que todos os doentes na fase estável da doença devem ser submetidos AFR e estudo dos gases no sangue arterial seriados⁽¹⁴²⁾.

Tendo em consideração que a SatO_2 se relaciona com a PaO_2 e com o valor de Hb média, e que estes valores estão aumentados, este estudo mostra que mesmo sem qualquer atitude terapêutica houve melhoria do estado clínico dos doentes. Este facto testemunha a importância dos cuidados de saúde primários e do acompanhamento e informação destes doentes e seus familiares.

Apenas num doente (3,3%) se observou um padrão obstrutivo. Este doente foi o que durante toda a evolução clínica evidenciou maior número de episódios da STA nem sempre acompanhados de terapêutica transfusional.

Os dois doentes (6,6%), ambos do sexo masculino, com asma moderada tiveram resultados da AFR diferentes mantendo uma capacidade de difusão normal. Enquanto um dos doentes apresentava um padrão restritivo, no outro os resultados da avaliação foram normais, o que revela divergências no que respeita ao papel da hiperreactividade brônquica na fisiopatologia da lesão pulmonar demonstrada também por alguns autores^(123, 211, 230).

Num outro doente verificou-se a existência de apneia do sono por obstrução amigdalina e adenoideia associada a DPR. Estes factores são considerados precipitantes de EVO por contribuírem para a descida da SatO_2 para valores tão significativos como 40 a 50%^(63, 374).

Influência dos parâmetros seleccionados na função pulmonar

Dos factores genéticos estudados, os **haplotipos** não foram considerados indicadores de prognóstico. Entre estes, o haplotipo Bantu apresenta uma grande prevalência, superior a 50%, podendo eventualmente esperar-se uma má evolução destes doentes. O facto de tal não se ter verificado deve-se, provavelmente, à existência de factores epistáticos ou outros que não foram objectivo deste estudo.

Ao genotipo **α -talassémia**, quando associado à ACF, tem sido atribuído o efeito protector nas formas de evolução clínica grave. No presente estudo não foi possível confirmar este aspecto, uma vez que todos os doentes estudados apresentaram uma evolução moderada.

Não se verificaram diferenças significativas quanto à **idade** dos doentes com lesão restritiva pulmonar em relação aos que têm função pulmonar normal ($p=0,597$). Estes resultados são consistentes com a hipótese de que outros factores, que não a idade, possam ter contribuído para o agravamento da doença pulmonar restritiva durante os três anos de estudo. O peso dos factores ambientais na ACF pode ter, muito provavelmente, exercido influência, o que não foi avaliado neste estudo.

Especula-se até que ponto a evolução estatural e a puberdade possam influenciar a função pulmonar, o que implica a necessidade de estudos longitudinais para a verificação de tal hipótese ^(317, 401, 436, 479).

Os estudos anteriores provaram que os adultos têm alterações restritivas da função pulmonar, as quais são o resultado de episódios vaso-oclusivos repetitivos, começando na primeira década de vida e aumentando com a idade ^(249, 374, 406).

No que se refere aos **parâmetros clínicos**, foi demonstrado que os doentes com mais de três EVO/ano têm seis vezes mais probabilidade de terem lesão pulmonar do que aqueles doentes com menos de três EVO por ano, O.R.= 6 IC (0,78-48,14) ($p=0,102$), podendo inferir-se que o número de EVO constitui indicador de mau prognóstico relativamente à lesão pulmonar.

Desta correlação conclui-se que o carácter repetitivo dos EVO predispõe a DPR e que as provas de função pulmonar estão alteradas muito tempo antes do aparecimento da sintomatologia clínica. A acrescentar, a capacidade de tolerância à dor destes doentes procurando as instituições hospitalares apenas no auge da dor, e considerando que a falciformação sub-clínica crónica é a origem de lesão pulmonar

progressiva ⁽³⁷³⁾, os EVO devem por isso ser considerados indicadores de mau prognóstico.

As STA não foram factores de risco para a DPR O.R.=0,4 IC (0,066-2,47) (p=0,419). Apenas num doente se verificaram alterações obstrutivas na AFR, precisamente naquele que tinha maior número da STA e com internamentos mais graves e mais prolongados.

O impacto dos antecedentes da STA na função pulmonar em doentes com ACF tem sido controverso. Segundo estudos feitos por alguns autores a DL_{CO} diminui de acordo com a frequência da STA, pelo que as STA são considerados marcadores de gravidade da doença ^(341, 406, 462).

Os resultados deste estudo estão de acordo com os de outras séries ^(298, 331, 375), no que se refere à influência da STA na génese da doença pulmonar restritiva. Tais estudos concluíram que a DL_{CO} diminui proporcionalmente ao número da STA, o que não se verificou nesta série.

Poderá especular-se que episódios repetidos de oclusão microvascular sub-clínica do pulmão progridem mesmo na ausência de DPR e que cumulativamente são responsáveis pela DPCF.

Estes dados contraditórios, não tiveram até à data explicação clínica plausível.

Em suma: os resultados deste estudo não excluindo a possibilidade da STA ser considerada indicador de prognóstico para a DPCF, não permitiram demonstrar tal hipótese, para o que seria necessário um estudo prospectivo mais prolongado.

No que respeita aos **parâmetros hematológicos** (HbF, as cadeias γ , reticulócitos e plaquetas) apenas foram encontrados indicadores de bom prognóstico valores de HbF $\geq 13\%$ e de Hb $\geq 8,5$ g/dl. Os níveis de Hb na ACF situam-se entre 6 e 9 g/dl, embora no estado basal possam variar entre 5-13 g/dl ^(372, 390, 469). Do estudo hematológico efectuado infere-se que dos parâmetros estudados, a Hb média e a HbF são indicadores de bom prognóstico para a DPR.

Dos restantes resultados hematológicos, os leucócitos com valores $11.79 \times 10^3/\mu\text{l}$ não foram considerados indicadores de prognóstico, dado contraditório ao referido na literatura por outros autores, que consideram os leucócitos factores de risco quando apresentam os valores $\geq 15 \times 10^3/\mu\text{l}$ ⁽⁴⁶⁹⁾, tal não se verificou neste estudo. A falta de

significado estatístico relativamente ao número de leucócitos, neutrófilos, monócitos e das plaquetas atribuída por outros autores ^(32, 311, 439, 469, 493), poderá estar relacionada com a boa evolução clínica observada durante o período de estudo e demonstrada pelos valores de Hb média e HbF referidos anteriormente.

Os **parâmetros sócio-económicos** não tiveram significado estatístico nem clínico quanto à importância no aparecimento de lesão pulmonar, o que se poderá atribuir à melhoria nos cuidados primários de saúde prestados.

Nesta população em que predominaram as classes mais precárias segundo a escala de Graffar adaptada é relevante a importância dos cuidados primários de saúde, das informações prestadas ao doente e seus familiares, do interesse da terapêutica profiláctica, do rastreio dirigido e do diagnóstico pré-natal.

Radiografia do tórax

Nos doentes com ACF as primeiras manifestações pulmonares correspondem a uma diminuição ligeira do número de vasos pulmonares distais associada a uma fibrose fina e difusa.

Não se verificaram alterações específicas nas radiografias do tórax nem correlação com as alterações observadas na TCAR, donde se infere a falta de especificidade das radiografias do tórax no diagnóstico das doenças pulmonares na ACF ^(282, 283, 284).

Assim, no grupo pediátrico dos doentes estudados, a não evidência radiológica de alterações do parênquima pulmonar na fase inicial da doença não surpreende, uma vez que a importância deste exame revela-se no controlo terapêutico das complicações agudas e na evolução clínica da deterioração pulmonar.

A cardiomegalia diagnosticada em 80% dos doentes é ligeira com índices cardio-torácicos entre 50 e 61%, apresentando uma correlação negativa e não significativa com os volumes pulmonares ($r=-0,334$; $p=0,07$) e uma correlação igualmente negativa mas com significado estatístico para os valores de Hb ($r=-0,155$; $p=0,012$). Deste modo, as cardiomegalias não interferem com o tamanho dos volumes pulmonares mas relacionam-se com valores de Hb de 8,5 g/dl.

Tomografia computadorizada de alta resolução no diagnóstico da lesão pulmonar

Admite-se, através de estudo já publicados ^(45, 339) que a TCAR possa desempenhar um papel de relevo na avaliação inicial do doente em crise, para o diagnóstico diferencial de infecção e enfarte pulmonar, e durante a fase estável da doença para o diagnóstico da micro-oclusão vascular e para o grau e extensa da fibrose ⁽³³¹⁾. A TCAR é, pois, um método de estudo que nos permite visualizar todo o parênquima pulmonar incluindo alterações a nível lobar, definir estruturas intersticiais e vasculares.

A principal alteração encontrada neste estudo foi a existência de traços fibróticos em 82,3% das alterações pulmonares. A positividade dos resultados da TCAR em cerca de metade dos doentes (43,3%) relaciona-se com o padrão da DPR ligeira encontrada em 33% destes doentes.

Num dos doentes com hipertensão pulmonar e hiperreactividade brônquica, as manifestações imagiológicas são uma mistura de alterações relacionadas com a asma e de traços fibróticos devido a fenómenos vaso-oclusivos.

Não se verificou concordância entre os resultados dos TFP e as alterações detectadas pela TCAR, provavelmente porque nos TFP a DLco é mais sensível em detectar doença vascular e a TCAR é mais sensível para detectar doença intersticial. Estes resultados estão de acordo com os de outros autores ^(25, 165, 183).

Avaliação cardiovascular

As alterações cardiovasculares em doentes com ACF estão documentadas desde 1960, tendo sido descritas pela primeira vez por J. Herrick no primeiro doente em que ele observou as alterações hematológicas da doença.

Desde então, muitos são os estudos que documentam a presença de sintomas cardíacos congestivos e de disfunção ventricular esquerda na ACF, ainda que a disfunção das cavidades direitas, apesar de ser bem conhecida, esteja mal caracterizada ⁽⁸⁷⁾.

Durante as consultas programadas nos três anos de estudo, em todos os doentes foi audível um sopro cardíaco sistólico de grau II, manifestação constante da ACF ^(30, 37, 87, 454); e em 80% dos doentes foi observada cardiomegalia na radiografia do

toráx⁽¹³⁵⁾. Este facto não surpreende, sabendo que as alterações devidas à hipervolemia, resultantes da anemia crónica são reversíveis com a correcção da anemia e que os doentes com evolução mais desfavorável foram submetidos a terapêutica transfusional em simultâneo com terapêutica quelante com desferroxamina B ⁽³⁵⁹⁾.

Na avaliação da influência da **idade** no aumento das cavidades cardíacas não se encontraram diferenças com significado estatístico ($p=0,282$), ainda que segundo alguns autores estas alterações possam surgir depois dos dois anos de idade ou mesmo em idades mais precoces ⁽²³¹⁾.

Alterações cardíacas demonstradas pelos **ECG** têm sido documentadas em diferentes percentagens na ACF mas não são específicas.

A percentagem de doentes que apresentam cardiomegalia é ligeiramente inferior à referida por outros autores ⁽¹³⁵⁾. Nestes doentes os sinais de hipertrofia ventricular esquerda (53,3%) e de hipertrofia ventricular direita (10%) estão de acordo com os encontrados noutros estudos, 18-59% e 10-15% respectivamente ^(30, 37, 231).

As alterações cardíacas identificadas no **estudo ecocardiográfico** de doentes com ACF mostram o aumento do volume das cavidades do coração esquerdo, principalmente DVE. A DVE observada em 86,7% dos doentes, do ventrículo direito em 10% e da aurícula esquerda em 33,3%, são similares aos de outras séries pediátricas ^(39, 135, 192, 359).

Para compensar a anemia crónica nestes doentes, o débito cardíaco aumenta mantendo a libertação do O₂ a nível tecidual. A anemia crónica da ACF é acompanhada por elevação da volémia (aumento da pré-carga) e por diminuição da viscosidade assim como das resistências vasculares periféricas (diminuição da pós-carga), ambas as situações aumentam a contractilidade e volume de ejeção ^(39, 454).

As condições referidas aumentam a capacidade ventricular e, teoricamente, seria de esperar índices funcionais mais elevados.

Deste modo questiona-se: será que os 20,5% destes doentes que apresentam parâmetros de função cardíaca "normais", não têm já algum grau de compromisso da função ventricular? (por exemplo, função ventricular sub-ótima). Os testes de *stress* (prova da dobutamina/prova de esforço) poderão vir a ser úteis para evidenciar precocemente uma disfunção ventricular latente ^(231, 234).

Apenas num doente se desenvolveu hipertensão pulmonar ligeira (3,3%). Apesar de ser comum nos doentes com ACF e de se relacionar com o processo de fibrose intersticial pulmonar progressivo, a pequena percentagem encontrada neste estudo deve-se em parte à idade pediátrica dos doentes.

A ausência de miocardiopatia hipocinética nesta série compreende-se pela raridade de ocorrência de isquémia nestas situações e pelo bom controlo da terapêutica transfusional e quelante ^(87, 135, 169, 340).

Enquanto os enfartes, ósseo, cerebral e enfarte pulmonar são frequentes, o enfarte do miocárdio é raro principalmente em crianças, o que se deve às características da circulação coronária e da fisiopatologia da ACF: o encurtamento do *delay time* no capilar do miocárdio, inferior a um segundo, não permite que ocorra a falciformação, apesar da grande extracção de oxigénio ^(60, 294).

Na ACF a dilatação das cavidades cardíacas relaciona-se com um *status* hemodinâmico hipercinético, devido a anemia grave e crónica que é mais acentuada nesta doença em relação às outras anemias crónicas, dada a alteração das características reológicas dos eritrócitos falciformes e à vasculopatia.

A dilatação ventricular esquerda relaciona-se inversamente com o grau da anemia e com a HbF e, directamente, com a HbS, ainda que nesta última sem significado estatístico - Figura 15. Assim, valores baixos de Hb média associam-se à existência da DVE e valores elevados de HbF correlacionam-se com a diminuição da DVE sugerindo o seu papel protector. Estes parâmetros são considerados indicadores hematológicos de prognóstico para a lesão cardíaca.

Pelo estudo do ecocardiograma confirma-se a elevada existência da DVE ^(106, 301).

No estudo da influência dos parâmetros hematológicos e clínicos na DVE verifica-se que embora a Hb esteja inversamente relacionada com a DVE, não existe relação entre DVE com o número de EVO nem com a DPR.

Pode concluir-se que as alterações cardíacas nas crianças e adolescentes estão associadas à própria anemia e à fisiopatologia da doença, não se verificando uma repercussão significativa da DPR na função cardíaca, provavelmente devido à idade dos doentes, ao grau ligeiro de DPR e ao tempo de duração do estudo.

Em suma: dos resultados infere-se que as crianças desta investigação apresentam cardiomegalias ligeiras que neste período do estudo não são responsáveis pela diminuição dos volumes pulmonares.

Existem diferenças significativas da função pulmonar em relação aos controlos.

A avaliação da função pulmonar apresenta um padrão restritivo ligeiro em 70% dos doentes, o qual não interfere com as trocas gasosas uma vez que a difusão alveolar está conservada.

A TCAR não apresentou concordância com as provas da função pulmonar nem foi importante para o diagnóstico das lesões, provavelmente por estas serem incipientes. As complicações pulmonares agudas, nomeadamente as STA presentes em 56,5% não são preditivas de DPR, ao contrário dos EVO que cumulativamente se relacionam com a lesão pulmonar.

Considerando o estudo dos parâmetros hematológicos, apenas a HbF de 13% e a Hb média de 8,5 g/dl foram consideradas indicadoras de bom prognóstico para a evolução da lesão pulmonar. No entanto, o número de leucócitos $11.79 \times 10^3/\mu\text{l}$ foi um indicador de mau prognóstico.

As alterações cardíacas encontradas estão apenas relacionadas com a própria anemia. Donde se pode inferir que a existência de DPR neste grupo de doentes constitui um factor de morbilidade para a ACF, ainda que não interfira com a integridade da difusão pulmonar durante o período estável do estudo.

ESTUDO 2

Sistema nervoso central

A importância da imagiologia

Nas crianças com ACF a neurovasculopatia é responsável pela grande morbilidade e mortalidade, considerando o risco de AVC e de ES.

Os AVC são das complicações neurológicas da ACF, a mais grave, com sequelas das funções motora e intelectual, de difícil recuperação e por vezes fatais ^(163, 175, 309). Sabe-se também que os doentes que tiveram um AVC estão em risco de

subsequentes eventos neurológicos e que existe uma associação entre os ES e os défices neuropsicológicos ^(206, 324, 341).

Os ES ao progredirem durante meses ou anos obrigam à necessidade de detecção precoce antes de originarem sintomatologia e eventuais complicações.

Para caracterizar o espectro de alterações no SNC neste estudo utilizaram-se várias metodologias: a RMN-CE, o DTC e os testes psicológicos. A avaliação neurológica não evidenciou alterações, sendo normal em todos os doentes.

Através da **RMN-CE** foram encontradas alterações em 40% dos doentes. Destas 16,7% correspondem a lesões de enfarte/isquémia sem atrofia, 6,7% apenas atrofia e 16,7% enfarte/isquémia e atrofia.

A frequência de ES (33,3%) nesta amostra populacional foi aproximadamente duas vezes superior à encontrada no estudo da história natural doença ⁽²⁷⁸⁾ mas similar à de outros estudos mais recentes: Kinney em 1999 (21,8%), Wang em 2000 (22%) e de Pegelow e Steen em 2001 (37% e 46%) ^(213, 324, 401, 475).

As lesões de ES localizam-se principalmente na substância branca profunda enquanto os AVC situam-se tanto na substância branca como no córtex. Nestas duas situações, a sua distribuição atribui-se ao maior compromisso da circulação nas artérias do polígono de Willis do que da circulação vertebro-basilar.

Admite-se que a localização dos ES na substância branca profunda se possa justificar pelos aspectos anatómicos e fisiopatológicos inerentes ao SNC. As arteríolas que irrigam o córtex estabelecem abundantes conexões, entre elas; enquanto as arteríolas que irrigam a substância branca cerebral carecem de tais conexões sendo consideradas vasos terminais ⁽⁴¹¹⁾. Nestes é mais acentuada a diminuição do fluxo de sangue e a diminuição da perfusão, condições relacionadas com a hipóxia crónica e grave em que vivem estes doentes.

A relação entre ES e AVC não está completamente esclarecida; por outro lado a hemodinâmica cerebral na ACF é diferente da das outras doenças vasculares e carece de posteriores estudos.

Das variáveis seleccionados que estão relacionadas com o prognóstico das lesões do SNC identificaram-se alguns indicadores de prognóstico. Os parâmetros genéticos

quer o haplotipo quer a α -talassémia influenciam a expressão clínica das complicações cerebrais.

Embora se verifique um predomínio do haplotipo Bantu na forma homozigótica (53%) e nas formas heterozigóticas (25%), apenas um doente (8,3%) apresentou o haplotipo Senegal na forma homozigótica. O haplotipo Senegal na forma homozigótica associa-se a formas ligeiras de doença ⁽²⁹⁰⁾. Apesar de ser melhor para o prognóstico da doença é pior para a lesão cerebral, mas não teve expressão clínica nesta amostra populacional por se encontrar apenas em três doentes (9,4%). Uma vez que o haplotipo Bantu em vantagem neste estudo se relaciona com pior evolução clínica da ACF, pode especular-se sobre se o mesmo constitui um factor de risco para o aparecimento dos ES.

A ausência de significado estatístico encontrado no estudo destes parâmetros como factores de risco para o aparecimento dos ES pode estar associada a outros factores, nomeadamente: factores epistáticos, ambientais, sócio-económicos e a acessibilidade a cuidados primários e secundários.

O efeito protector da α -talassémia na ACF pode estar relacionado com diminuição da hemólise e melhoria das propriedades reológicas dos eritrócitos, principalmente com o aumento da Hb ou com a baixa de VGM ^(6, 34, 376). Neste estudo não se confirmou o efeito protector da α -talassémia, provavelmente relacionado com o tamanho da amostra populacional ^(6, 268).

Quanto aos parâmetros hematológicos, o valor do número de leucócitos de $12.390 \times 10^3/\mu\text{l}$ que foi encontrado no estudo do SNC é similar aos resultados apresentados por outros autores ⁽³⁴⁾ e é considerado um indicador de mau prognóstico, uma vez que a sua interacção com o endotélio vascular contribui para a vaso-oclusão.

O valor da HbF de 8,57% assim como a Hb média de 8,4 g/dl, esta última sem significado estatístico, foram considerados indicadores de bom prognóstico, protegendo os doentes com estes valores do aparecimento de ES. A HbF evidenciou o seu efeito protector para a lesão cerebral por diminuir a falciformação e melhorar as propriedades reológicas dos eritrócitos falciformes.

Segundo estudos anteriores, as STA são consideradas factores de risco para os AVC quando surgem duas semanas antes do evento ⁽³⁰¹⁾, o que se explica pela hipóxia

relacionada com a doença pulmonar. Este não foi objectivo deste estudo; com efeito as STA referem-se ao número total de episódios por ano e portanto não surpreende que não sejam indicadores de prognóstico para os ES.

O número de EVO não teve significado estatístico ($p=0,594$), verificando-se que o maior número de EVO se relacionou com os ES, na proporção de 7/10 doentes (70%), resultado contrário ao referido por de Kinney em 1999 ⁽²⁰²⁾. Mesmo nos três doentes (10%) com história de dactilite no primeiro ano de vida, considerada também factor de risco, não se observaram ES na RMN-CE.

Enquanto que os factores de risco para os AVC estão bem definidos ⁽³⁰⁹⁾, os factores que protegem os doentes com ACF dos ES estão em estudo.

O **DTC** é um método de fácil execução, não invasivo, bem tolerado pelos doentes e não dispendioso que ao detectar aumento da velocidade do fluxo de sangue nas artérias do círculo de Willis prevê risco de AVC em doentes com ACF ^(4, 5, 9, 324).

Constitui um bom meio de diagnóstico para o rastreio da vasculopatia cerebral, conhecido desde os anos 80 ainda que o grande impacto no estudo da ACF tenha surgido nos anos 90.

A estenose das grandes artérias cerebrais, nomeadamente a artéria cerebral média e a artéria carótida interna, predispõem a AVC isquémico ^(4, 5).

A velocidade de sangue através das artérias está directamente relacionada com o fluxo de sangue cerebral e inversamente relacionada com o diâmetro das artérias. O aumento focal da velocidade indica estenose da artéria, enquanto que o aumento bilateral da velocidade representar doença arterial bilateral, aumento do fluxo cerebral ou ambos.

Nos primeiros critérios de Adams foram definidos parâmetros de anormalidade detectados pelo DTC, posteriormente o mesmo autor deu mais importância às velocidades de fluxo dado o seu impacto no diagnóstico e prevenção dos AVC ^(5, 10, 13, 67).

Quando se usa o DTC para o diagnóstico das estenoses focais dos grandes vasos cerebrais e de alterações da velocidade do fluxo do sangue, devem considerar-se outros factores também responsáveis pelo aumento da velocidade do fluxo tais como, a idade e a gravidade da anemia ou melhor com a diminuição do hematócrito ^{(3, 64,}

⁴⁰⁸⁾. Assim quando as velocidades das grandes artérias cerebrais estão aumentadas ($\geq 200\text{cm/segundo}$) e ao mesmo tempo se verificam alterações na angioRM, o DTC tem valor diagnóstico legitimando iniciar um regime transfusional regular ^(5, 12, 176, 244).

A anemia crónica grave associada a uma velocidade aumentada do fluxo de sangue cerebral contribui para vasculopatia. Neste estudo a ausência de vasculopatia na grande maioria dos doentes provavelmente relaciona-se com os valores de Hb entre os 8 e 9 g/dl e com valores condicionais dos fluxos cerebrais detectados pelo DTC.

Dos quatro doentes submetidos a exames por DTC só um tinha velocidade do fluxo cerebral de 196 cm/segundo. Esta poderá ser considerada factor de risco para os AVC. Neste doente procedeu-se à angio-RM que confirmou a estenose e mostrou a sua localização, extensão e gravidade da lesão tendo sido submetido a regime transfusional regular - Figura 24. Esta pequena percentagem de lesões encontradas (3,13 %) não nos permite tirar conclusões dadas a duração do estudo e o pequeno número de doentes.

O recente estudo da experiência STOP – Janeiro 1995 a Novembro 1996 (*Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*) mostrou uma redução de 70% do risco do primeiro AVC nos doentes com ACF quando submetidos a regime transfusional ^(8, 11, 12, 323).

A terapêutica profiláctica com regime de transfusões regulares (3/3 ou 4/4 semanas) com a finalidade de diminuir a concentração de HbS para valores iguais ou inferiores a 30%, inicia-se quando se confirmam velocidades elevadas no DTC ($\geq 200\text{ cm/segundo}$) num intervalo de duas semanas ⁽¹²⁾.

Apesar do sucesso desta experiência devido à grande redução do risco do primeiro AVC e da recorrência dos mesmos levou a que presentemente outros estudos, com novas metodologias, prossigam para se determinar o tempo de duração da terapêutica, considerando o risco e o benefício de uma terapêutica transfusional crónica (aloimunizações e hemosiderose).

Uma vez que o aumento da velocidade do fluxo cerebral é um indicador directo do aumento do fluxo de sangue e **indirecto de** estenose nos grandes vasos, e considerando que os ES têm implicações no desenvolvimento de ulteriores AVC, segundo Kugler, Pegelow e Miller ^(213, 324, 264), o DTC estaria indicado para detectar

também os ES ⁽³²⁴⁾. Estas hipóteses, ainda não confirmadas, carecem de outros estudos.

A prevenção de AVC através da identificação de doentes em risco, é uma importante área de investigação pelo que são necessários estudos prospectivos mais alargados.

Avaliação do neurodesenvolvimento

Os resultados revelam que os doentes com ACF na forma homozigótica têm défices nos testes psicológicos mesmo na ausência de complicações neurológicas evidentes ^(81, 206).

As alterações encontradas nos testes psicológicos em 80% dos doentes podem considerar-se ligeiras. Apenas, sete doentes obtiveram nos testes de WISC-R e WAIS um resultado inferior a 70, e em 44% destes relacionavam-se com a presença de ES na RMN-CE. A maioria das crianças com lesão encefálica na RMN-CE apresenta défices cognitivos, nomeadamente dispersão da atenção, organização perceptiva e do coeficiente de inteligência ⁽¹³²⁾. No entanto, em 40% do total dos doentes com testes psicológicos alterados as RMN-CE eram normais.

Estes resultados são sobreponíveis aos referidos por outros autores ao mostrarem que os ES são, não só complicações neurológicas frequentes nos doentes com ACF, mas também são responsáveis por défices cognitivos, mesmo na ausência de alterações na RMN-CE ^(132, 213, 398, 442, 433, 494).

Os parâmetros genéticos, nomeadamente os haplotipos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação às alterações do neurodesenvolvimento provavelmente pela diversidade de haplotipos encontrada nesta amostra ou pela presença de outros factores epistáticos. Este resultado está de acordo com o de outros autores ^(345, 350).

Quanto à deleção de um gene da α -talassémia, a sua relação com os testes da escala de inteligência de Wechsler apresentou significado estatístico ($p=0,050$) e como tal é um indicador de bom prognóstico por melhorar a capacidade de inteligência destes doentes.

O efeito protector da α -talassémia na HbSS também referido por Adams e Serjeant ^(2, 6, 393) deve-se à diminuição do fluxo do sangue, nas grandes artérias pelo aumento da viscosidade relacionada com a elevação dos valores da Hb, e ao aumento do fluxo nos capilares pela diminuição da falciformação em sequência da baixa da CHGM.

Globalmente entre os vários parâmetros hematológicos estudados apenas foram relevantes como indicadores de prognóstico o VGM, HGM e reticulócitos na medida em que os valores mais baixos (VGM e HGM) se associam a doentes com testes neurológicos não alterados. Este facto pode estar relacionado com a coexistência de um gene da α -talassémia na série estudada, condicionando os resultados obtidos. Verificou-se que os melhores resultados dos testes neuropsicológicos se relacionaram com valor médio de hematócrito 24% (95%) (22,98-24,85), embora sem significado estatístico ($p=0,08$). De referir que nestes doentes os valores de hematócrito se situaram entre 19,1 e 30,6%, e segundo alguns autores valores elevados de hematócrito relacionam-se com melhoria das capacidades intelectuais ^(3, 408).

No que respeita aos parâmetros clínicos não se encontraram diferenças com significado estatístico nos EVO e STA em relação à capacidade neuropsicológica dos doentes ($p=0,594$ e $p=0,979$ respectivamente), ainda que se tenha observado que todos os doentes com maior número de EVO têm em média valores inferiores nos testes, com excepção do Toulouse-Piéron (TP). A associação entre os resultados da avaliação da função intelectual e a presença ou a ausência de ES na RMN-CE está de acordo com o descrito em dois estudos recentes ^(20, 88).

Na ausência de lesão cerebral a alteração dos testes psicológicos sugere a existência de um processo patológico cerebral. Sendo o cérebro um órgão muito sensível a situações de hipóxia, na ACF vários processos patológicos contribuem para os défices do neurodesenvolvimento: ES recorrentes, a própria hipóxia crónica secundária à anemia ou a lesão subaguda por episódios de diminuição da pressão de oxigénio associados a crises de sequestração, crises aplásticas, STA graves, défices nutricionais crónicos e apneia do sono ⁽⁶³⁾. A hipoxémia crónica constante nestes doentes e a frequência dos microenfartes são factores importantes para a alteração da função neurocognitiva.

Os parâmetros socio-económicos, factores adicionais aos da própria doença, por sua vez têm repercussões no neurodesenvolvimento. Neste estudo verificou-se que os

parâmetros sócio-económicos evidenciaram ter significado estatístico ($p=0,027$) para o QI, observando-se de um modo geral que as crianças com melhor condição socio-económica atingem pontuações mais elevadas nos testes psicométricos.

Apesar de a ACF ser uma doença crónica, e o absentismo escolar ser relativamente frequente e esperado nestas situações, neste estudo 60% dos doentes evidenciaram $QI > 80$ e 23% $QI > 100$ e < 129 ^(132, 476).

O teste Toulouse-Piéron (TP) mede a atenção concentrada. Na presente investigação, em 30% dos doentes com coeficientes de inteligência normais verificou-se que o resultado deste teste estava alterado. É portanto de admitir que, uma vez superado o défice de atenção, estes doentes poderão atingir pontuações mais elevadas na escala de Wechsler. De acordo com outros autores a pontuação dos testes para avaliar o QI nos doentes são mais baixos do que nos controlos – Figura 25 ⁽⁴⁸³⁾.

A selecção do GC deve ser criteriosa e respeitar factores que possam contribuir para a variabilidade de resultados nos testes (padrão educacional, meio familiar e sócio-económico entre outros), donde se depreende que o ideal seria a comparação com irmãos saudáveis. Sendo difícil, senão impossível, dispor de irmãos saudáveis, fez-se neste estudo a comparação usando um GC com as características pré-definidas ⁽²⁹⁹⁾.

Sintetizando, os resultados dos testes psicológicos alterados no GC, podem-se explicar pelo baixo nível sócio-económico desta população e, por sua vez, estarem relacionados com diversos factores. Entre estes, incluem-se as deficiências nutricionais, nomeadamente de oligo-elementos, em períodos de particular vulnerabilidade do desenvolvimento do cérebro, os chamados períodos críticos ^(433, 495). A este facto associa-se o peso da doença crónica em toda a família nos seus diversos aspectos.

Comparação entre os diferentes métodos de avaliação da disfunção cerebral

Ainda que resultados do estudo CSSCD mostrem que os AVC surgem em 11% das crianças e adolescentes com menos de 20 anos na ACF, e que os ES ocorrem em 17%

nas primeiras duas décadas de vida, principalmente entre os seis e 14 anos de idade, os mecanismos fisiopatológicos que explicam a elevada frequência de enfarte no SNC, continuam por esclarecer ⁽²⁷⁸⁾.

Estudos prévios sugerem que os ES são preditivos de novos enfartes e de AVC ⁽²¹³⁾, conhecendo-se a gravidade destes últimos e a frequência dos primeiros; por isso o diagnóstico dos ES é um imperativo.

Admite-se que na ACF o fluxo de sangue cerebral está aumentado, existe uma vasodilatação crónica e uma resposta vascular inadequada ao *stress* hipoxémico, possivelmente induzido por STA, sequestrações esplénicas ou consequência das apneias do sono. Este conjunto de factores torna o cérebro mais vulnerável à hipoxémia independentemente da existência prévia de lesões estenóticas nas artérias carótida distal e cerebrais proximais.

Inúmeros estudos compararam as diferentes metodologias para avaliar a repercussão no SNC nos doentes com ACF ^(7, 27, 190, 296, 320, 322, 382, 494).

Num estudo, em 21 doentes com história de AVC, as velocidades do DTC correlacionaram-se com os resultados da RMN-CE na doença cerebrovascular ⁽³⁸²⁾. Noutro estudo mais recente, 58 doentes foram rastreados e em 9 as velocidades nas artérias cerebrais médias eram superiores a 190 cm/segundo e confirmadas pela arteriografia, tendo-se concluído que o DTC era válido para detectar estenoses arteriais ⁽⁴⁾. Outros ainda verificaram que a RMN-CE teve mais sensibilidade para avaliar os ES do que os DTC, realçando outros estudos o contrário ⁽⁴¹⁰⁾.

Num estudo mais recente, feito em 2000, em 78 doentes comprovou-se que 4/10 doentes com DTC alterados tinham lesão na RMN-CE ⁽⁴⁷⁵⁾.

Estes últimos resultados são semelhantes aos da presente investigação, em que 25% dos doentes evidenciaram por sua vez sinais anómalos na RMN-CE. Dos 12 doentes com RMN-CE alterada 8 tinham DTC normais, o que significa que 27% dos doentes não apresentaram estenose dos grandes vasos. Nestes, o estreitamento dos vasos pode estar limitado aos pequenos e médios vasos ou, em alternativa, a velocidade elevada do DTC pode ter surgido *à priori* do ES e ter desaparecido *à posteriori*. É também possível que a fisiopatologia dos ES seja diferente dos AVC. A associação das STA com os AVC e a falta desta associação com os ES ⁽²⁰²⁾ dá suporte

ao conceito de que os ES poderão resultar de isquémia cerebral mais localizada na substância branca profunda.

Nos doentes com RMN-CE alterada e DTC normal houve predomínio de EVO e crises de hiper-hemólise mas não de outros factores de risco, tais como história prévia da STA, sequestrações ou dactilite no primeiro ano de vida.

Porque os exames da RMN-CE e do DTC não foram feitos em simultâneo, os resultados obtidos pelas duas técnicas poderão explicar-se pelo aparecimento de algum evento entre os exames ou na sequência dos mesmos; admitimos, no entanto, que a discordância não esteja relacionada com o intervalo entre os exames (8 meses), nem com a sequência com que foram realizados os exames (em 43% dos casos os DTC foram feitos antes da RMN-CE e em 57% depois).

A comparação entre os resultados obtidos na RMN-CE e no DTC é susceptível de controvérsia ^(325, 475). Com efeito, a grande variabilidade de resultados do DTC poderá estar relacionada com a ausência de normas e de valores convencionais para a sua interpretação, com a frequência com que é feito o rastreio e com a idade dos doentes a seleccionar ⁽²⁹⁶⁾.

Nesta investigação, os resultados entre os dois exames foram discordantes, o que está de acordo com encontrado por alguns autores ⁽⁴⁷⁵⁾ mas não coincidentes com estudos em grandes séries ⁽⁵⁰⁸⁾.

Os DTC provaram o seu valor na identificação das crianças em risco de ES e de AVC, e provavelmente a necessitarem de intervenção terapêutica, tal como: regime transfusional regular, medicação com hidroxureia ou transplante medular. Contudo a presença de ES na RMN-CE pode indicar compromisso da capacidade neuropsicológica e os estudos psicométricos serem um indicador mais sensível.

Apesar de não se verificar correlação entre a RMN-CE e os testes psicológicos, estes revelaram ser um método sensível para a detecção precoce da lesão cerebral e para orientação em programas de educação especial, necessários antes dos doentes serem admitidos em instituições de ensino.

ESTUDO 3

Terapêutica com hidroxiureia

A possibilidade de se poder dispor, ao fim de quase um século, de várias modalidades terapêuticas todas com a finalidade de diminuir a morbidade e mortalidade da ACF, reflecte o grande esforço dos investigadores em todos os domínios da ciência.

As medidas profilácticas relacionadas nomeadamente com a utilização de penicilina e de vacinas específicas constituíram um passo importante para diminuir a morbidade e mortalidade pela pneumococémia e por outras doenças⁽¹⁸¹⁾.

As transfusões de sangue usadas em todo o Mundo continuam a ter efeitos deletérios designadamente relacionadas com processos de isoimunização secundária, a hipersiderose e ainda a transmissão de doenças infecciosas, estas últimas mais frequentes nos países africanos. Os transplantes da medula óssea e a terapia génica são ainda impraticáveis nos países onde é elevada a prevalência da ACF.

A necessidade de uma terapêutica dirigida e adequada que possa combinar eficácia, baixa toxicidade e fácil administração com custos reduzidos constitui mais do que uma emergência um imperativo.

A indução da HbF pela HU é de todas as terapêuticas até agora em estudo a que demonstrou maior efectividade no tratamento das complicações da ACF, representando já um marco nas medidas terapêuticas para esta doença^(76, 105, 270, 308, 366, 417, 453).

Os bons resultados obtidos desde 1984 em adultos com ACF, levou quinze anos mais tarde a iniciar a mesma terapêutica em crianças⁽²⁰¹⁾.

Em 1993 foi publicado o primeiro ensaio clínico da HU em crianças, ao qual outros se sucederam, em todos se tendo demonstrado eficácia clínica e laboratorial assim como a baixa toxicidade em idade pediátrica^(127, 179, 188, 209, 307, 308, 368, 379). Destes, referimos três na Europa⁽⁹⁴⁾, dois na Bélgica^(128, 316) e um em França⁽²⁷⁰⁾, vários na América do Norte^(188, 308, 312, 368, 379) e um em Israel⁽²⁰⁹⁾.

Do nosso conhecimento, a presente investigação corresponde ao primeiro estudo prospectivo publicado e realizado em Portugal assinalando-se um artigo prévio de revisão sobre medidas terapêuticas e profiláticas ⁽²¹⁹⁾.

A amostra populacional, com origem geográfica na costa ocidental de África representa a primeira geração de imigrantes no nosso país.

A base genética destes doentes é relativamente homogénea; na sua maioria (71,4%) são portadores de homozigotia para o haplotipo Bantu. Os haplotipos do gene da β -globina são marcadores genéticos que modulam a expressão clínica da ACF ⁽³⁴⁶⁾. O haplotipo Senegal com valores mais elevados de HbF e mais baixos de HbS diminuição da hemólise relaciona-se com melhor evolução clínica, enquanto que o haplotipo Bantu geralmente associado a níveis mais baixos de Hb F e mais elevados de HbS têm um curso clínico mais grave. O haplotipo Benin com valores intermédios de HbF e HbS em relação aos anteriores, a sua evolução é moderada.

No entanto, neste estudo tal como noutro publicado por Carache *et al.* ⁽⁷⁵⁾ a HbF não se relacionou com o haplotipo da β -globina ao contrário do que se verificou nos estudos feitos em séries maiores tais como os de Kinney e Maier-Redelsperger ^(201, 241). Donde se pode inferir que o tamanho da amostra populacional provavelmente influenciou este resultado, o que poderá constituir uma limitação.

A associação da ACF com o gene da α -globina além de melhorar as propriedades reológicas dos eritrócitos falciformes, diminui a probabilidade da STA ainda que aumente a de complicações ósseas, tais como os EVO e a necrose asséptica da anca ⁽¹⁷²⁾.

Na amostra populacional estudada três doente apresentaram concomitantemente uma deleção do gene α -talassémia. O número restrito de doentes não permite que se tirem ilações; no entanto observou-se que a doente com um episódio de SDMO aos 12 anos de idade, teve uma boa evolução clínica até à ocorrência desta complicação, apesar de ser portadora do haplotipo Bantu associado a um valor baixo de HbF (0,5%).

A resposta clínica à HU teve significado estatístico para todos os parâmetros excepto para o número da STA por ano. Porém, devido ao tipo de estudo aberto não controlado, o efeito placebo não pode ser desprezado. A este propósito acresce referir

que não é possível estabelecer comparações uma vez que não existem registos, em Portugal, sobre a gravidade clínica destes doentes.

À semelhança de todos os outros estudos pediátricos verificou-se uma diminuição significativa dos EVO, do número e duração de internamentos e do número de transfusões ^(204, 241, 306, 307, 315).

Como foi mencionado anteriormente, dois doentes, um com AVC e outro com SDMO tiveram uma evolução particularmente grave. Ambos mostraram os valores mais baixos de HbF deste grupo (0.7 e 0.5% respectivamente), tendo feito a HU e o RTR em simultâneo. A subida mais lenta da HbF que se observou nestes doentes deve-se provavelmente à depressão medular relacionada com RTR e às doses baixas de HU.

A decisão de iniciar a HU no doente com AVC baseou-se nos estudos feitos por Ware *et al.* em 1999 e, mais tarde, em 2002, pelo mesmo autor e por Sumoza que documentaram a eficácia da HU na prevenção da recorrência dos AVC considerando-a uma terapêutica alternativa às transfusões para o tratamento dos AVC, tanto nos adultos como nas crianças ^(430, 481, 482).

Desconhece-se o mecanismo exacto pelo qual a HU previne a recorrência de AVC, admitindo-se o envolvimento de vários processos fisiopatológicos.

Assim, segundo Bunn, o aumento a HbF é importante porque provavelmente previne a falciformação dentro dos vasos cerebrais estenóticos ⁽⁶⁵⁾; e segundo Helton valores baixos de Hb total são factor de risco para os ACV ⁽¹⁶⁸⁾. Outros possíveis mecanismos adicionais são: a redução do número absoluto dos leucócitos e reticulócitos ^(76, 424); aumento do *delay time* ^(60, 294); e a melhoria da deformabilidade dos eritrócitos, da adesão e do conteúdo em catiões ^(182, 424). Estes aspectos fisiopatológicos sustentaram o argumento de se usar a HU no doente com SDMO, para impedir a progressão da vasculopatia.

O aumento da HbF com significativo estatístico ($p=0,028$), provavelmente contribui para a melhoria clínica por diminuir a falciformação dos eritrócitos falciformes. Paradoxalmente os níveis de Hb não aumentaram de um modo significativo o que poderá estar relacionado com a eficácia da própria terapêutica.

Relativamente aos valores médios de VGM e HGM, os mesmos não aumentaram com significado estatístico ($p=0,094$ e $p=0,097$ respectivamente), o que se pode

atribuir à diminuição das células densas, células falciformes irreversíveis e outras células de morfologia anormal, representando eritrócitos de pequeno volume.

A variabilidade da resposta à HU e a discrepância entre o rápido benefício clínico e o atraso na elevação da HbF que se verificaram neste estudo, sugerem que a HU pode ser eficaz por outros mecanismos relacionados com genes epistáticos ou com a reserva do conteúdo de células da medula óssea^(127, 346).

Embora os primeiros estudos tivessem sugerido que níveis de HbF de 15 a 20% sejam necessários para se obter uma melhoria clínica⁽²⁹⁸⁾, dados mais recentes demonstram que níveis mais modestos da HbF *in vivo* (10%) têm a mesma eficácia⁽³³³⁾, tal como verificado nesta investigação.

De referir que o aumento do VGM, ainda que sem significado estatístico, foi concomitante com o aumento da HbF podendo, deste modo, considerar-se o VGM relevante para o controlo da eficácia da terapêutica com HU, tal como conclui Ferster *et al*⁽¹²⁷⁾.

A inexistência de formulação pediátrica em suspensão condicionou a idade de inclusão dos doentes e o modo de progressão da dose durante o tratamento. A dificuldade de ingestão das cápsulas e a posologia da HU em relação ao baixo peso dos doentes foram problemas nesta investigação.

A dose atingida 25mg/Kg/dia foi uma dose bem tolerada similar à de outros estudos^(312, 315, 368). Apesar de não se ter usado a dose máxima tolerada (30-35 mg /kg/dia) tal como Rodger e outros⁽³⁶⁸⁾, não se verificou perda da efectividade clínica durante este estudo.

Os doentes pediátricos comparados com os adultos respondem melhor^(75, 127, 201) e toleram bem o aumento da dose à HU, embora a mielotoxicidade seja o factor limitante da dose em ambas as populações.

Neste estudo apenas num doente se verificou neutropénia ligeira e transitória relacionada com uma intercorrência vírica e não com a toxicidade da HU, sem haver necessidade de se reduzir da dose, o que se poderá relacionar com a baixa toxicidade da HU comprovada desde os primeiros estudos^(75, 94).

Foi reportado um único caso de leucemia num doente tratado com HU^(94, 128, 461). Tal risco, assim como o risco de infertilidade, terá de ser confirmado por estudos a

longo prazo, pelos quais se torna importante manter-se uma cuidadosa vigilância destes doentes.

Se for confirmada a hipótese de que a terapêutica com a HU preserva a função dos órgãos ou, como já foi comprovado, reverte a disfunção esplénica, a HU deverá ser usada desde os primeiros anos de vida para diminuir a mortalidade ^(79, 312).

Recentemente, num estudo com 21 lactentes durante dois anos demonstrou-se a eficácia e boa tolerância da HU ⁽⁴⁷⁷⁾, abrindo perspectivas futuras à sua utilização neste grupo etário e portanto antes que a lesão orgânica se estabeleça. Aguardam-se os resultados do estudo ainda não publicado "BABY-HUG" feito também em lactentes com o objectivo de avaliar se a HU é susceptível de prevenir a lesão multi-orgânica.

Embora a avaliação do crescimento não fosse o objectivo principal do nosso estudo - o primeiro realizado em Portugal com HU em doentes com ACF - verificámos que, à semelhança de outros ⁽⁴⁷⁸⁾, a HU não teve qualquer efeito adverso na evolução ponderal, possivelmente porque esta terapêutica ao diminuir as complicações clínicas melhora o estado nutricional.

O Quadro XXI mostra os ensaios clínicos pediátricos da HU e as doses que foram programadas no início da terapêutica assim como a dose máxima tolerada, sem se terem registado efeitos tóxicos adversos. A maioria dos doentes (85-90%) teve uma subida dos valores de HbF acompanhada por uma modesta subida do valor da Hb total o que reflecte uma melhoria da sobrevida dos eritrócitos.

Quadro XXI. **Ensaio clínicos pediátricos da hidroxiureia na ACF**

Referência bibliográfica	Número de doentes	Dose inicial (mg/kg/dia)	Dose máxima (mg/kg/dia)
Scott <i>et al</i> (1996)	15	10-20	ND
Ferster <i>et al</i> (1996)	25	20	25
Jayabose <i>et al</i> (1996)	15	20	35
Montalembert <i>et al</i> (1997)	35	20	40
Oury <i>et al</i> (1997)	8	15	25
Rogers (1997)	13	15	35
Olivieri e Vichinsky (1998)	17	15	35
Braga <i>et al</i> (2005)	9	15	25

ND – não descrito

No estudo feito pelo grupo de Oury et al ⁽³¹⁶⁾ as doses e o número de doentes estudados são sobreponíveis aos deste estudo verificando-se em ambos a mesma eficácia quanto aos parâmetros hematológicos e clínicos em comparação com os estudos que utilizaram doses superiores.

Nos estudos realizados em idade pediátrica durante mais de três anos, e com a dose máxima tolerada, comprovou-se a boa eficácia da terapêutica com HU e a sua aparente segurança ^(128, 188, 241, 271, 307, 366, 379, 508).

As indicações da HU alargam-se se forem confirmadas as seguintes questões:

- A HU quando administrada nos lactentes pode interromper a comutação da HbF e deste modo alterar o fenotipo clínico da ACF por impedir a lesão multi-orgânica;
- A HU melhora a vasculopatia, assim poderá ser usada para a prevenção do primeiro AVC e/ou na recorrência dos mesmos e assim reduzir eventualmente os riscos das transfusões.

Conclusões

Da análise dos resultados deste estudo foi possível retirar algumas conclusões.

1. - Em relação às lesões identificadas no **sistema cardio-respiratório:**

- a doença pulmonar restritiva diagnosticada em 70% das crianças e adolescentes foi considerada incipiente, uma vez que:
 - não se encontraram alterações significativas da difusão e do estudo da saturação da hemoglobina em oxigênio no sangue arterial;
 - as alterações imagiológicas identificadas pela tomografia computadorizada de alta resolução permitiram identificar sinais de fibrose sem relevância clínica aparente.
- as alterações cardíacas encontradas através do estudo ecocardiográfico indicaram sinais de dilatação do ventrículo esquerdo em 86,7% dos doentes. Durante o período em que se desenrolou o estudo, tais alterações foram consideradas como associadas à própria anemia e à fisiopatologia e não como repercussão da lesão pulmonar.

Indicadores de prognóstico:

- considerando os *parâmetros clínicos*, verificou-se que o número de EVO superiores ou iguais a três por ano se associou a lesão pulmonar, ainda que sem significado estatístico.
- as STA detectadas em 57% dos doentes não foram consideradas indicadoras de prognóstico da doença pulmonar restritiva, contudo, em 27% dos doentes a STA associou-se a doença pulmonar restritiva.
- em relação ao sistema pulmonar, considerando os *parâmetros hematológicos*, verificou-se que valores de Hb $\geq 8,5$ g/dl e valores de HbF $\geq 13\%$ associaram-se a ausência de doença pulmonar restritiva.

- em relação ao sistema cardiovascular, o valor médio de Hb 7,6 g/dl associou-se a sinais electrocardiográficos de hipertrofia do ventrículo esquerdo. Os valores médios de HbF 14% foram considerados protectores relativamente à dilatação do ventrículo esquerdo e valores de 8,3% em relação ao ventrículo direito. A Hb e a HbF correlacionaram-se negativamente com a dilatação do ventrículo esquerdo. Quanto à HbS verificou-se uma correlação positiva em relação à dilatação do mesmo ventrículo.
- no que respeita às diversas variáveis estudadas, incluindo os *parâmetros genéticos* e os *parâmetros sócio-económicos*, não foram encontradas associações que permitissem identificar indicadores de prognóstico. De referir, no entanto, que se verificou existir uma associação entre os haplotipos Bantu, Senegal e Benin e a ocorrência de doença pulmonar restritiva em respectivamente 53,3%, 6,25% e 3,13% dos doentes.

2. - Em relação ao sistema nervoso central

- os enfartes silenciosos foram identificados em 33% dos doentes.
- através do estudo com DTC apenas num doente (3,3%) se registaram-se velocidades do fluxo de sangue de 196 cm/segundo relacionadas com vasculopatia grave.
- a avaliação do neurodesenvolvimento através dos testes neuropsicológicos permitiu a detecção precoce da doença neurovascular em 80% dos doentes.
- não se verificou concordância entre os resultados obtidos através da RMN-CE, do DTC e dos testes psicológicos. Verificou-se, no entanto, maior concordância entre testes psicológicos e a RMN-CE do que entre testes psicológicos e DTC.

Indicadores de prognóstico:

- considerando os *parâmetros hematológicos*, o valor médio de HbF 8,6 % é considerado indicador de bom prognóstico, protegendo os doentes de enfartes silenciosos. O número de leucócitos de $12.39 \times 10^3/\mu\text{l}$ associaram-se

ao aparecimento de enfartes silenciosos, sendo considerados indicadores de reserva quanto a prognóstico.

- quanto aos *parâmetros genéticos*, apenas a deleção de um gene da α -talassémia se associou a um bom desempenho das funções intelectuais e de aquisições escolares.
- avaliando os *parâmetros socio-económicos* e sua relação com os resultados dos testes psicológicos não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa; no entanto observou-se que os doentes com melhor situação sócio-económica apresentaram coeficientes de inteligência mais elevados.

3. - No que diz respeito à *terapêutica com a hidroxiureia* destaca-se:

- clinicamente houve melhoria de todos os parâmetros estudados, com uma diminuição mais acentuada do número de EVO (80%) e também no número e dias de internamento respectivamente (69% e 76%).
- a hidroxiureia demonstrou ser eficaz quanto ao aumento da HbF (5,3%).
- em relação à terapêutica transfusional verificou-se uma redução da necessidade da mesma em 67% dos doentes.
- não se observaram efeitos secundários à hidroxiureia quanto à sua toxicidade.
- a não concordância de alguns resultados com os encontrados por outros autores, leva a admitir que será necessário proceder-se a estudos multicêntricos a longo prazo e com metodologias uniformes para aferir indicadores de prognóstico em grupos populacionais de maior dimensão.
- outros parâmetros tais como factores genéticos epistáticos e moléculas intervenientes no processo da vaso-oclusão, ainda que em estudo, poderão vir a revelar-se como indicadores de prognóstico para avaliar a evolução da doença e monitorizar de um modo mais eficaz a terapêutica.

Sugestões para a prática clínica

As conclusões apresentadas legitimam, de acordo com a experiência adquirida algumas sugestões para a prática clínica:

- A necessidade de uma vigilância rigorosa do sistema cardiopulmonar e cerebral neste grupo etário, dada a elevada frequência das alterações encontradas.

- Perante as STA em todos os doentes está indicado o controlo seriado da determinação do grau de oxigenação tecidual e a atenção especial para a necessidade de eventuais transfusões simples sempre que o diagnóstico de STA seja confirmado.

- Não esquecer que *"pneumonia em doentes com ACF até prova em contrário é igual a STA"*. (Steinberg NH, carta pessoal à autora, 1999).

- No grupo etário de maior risco para os enfartes cerebrais, os doentes devem ser submetidos a DTC como exame rotina. Caso se observem alterações nas velocidades médias das artérias cerebrais, este exame associado a outros estudos de neurodiagnóstico será decisivo para se iniciar um regime transfusional regular.

- Sendo os testes psicológicos considerados importantes para o diagnóstico precoce das alterações do neurodesenvolvimento é relevante a precocidade do diagnóstico dos défices cognitivos para se poder decidir terapêuticas específicas antes do ingresso nas instituições de ensino.

- Nos doentes com valores baixos de HbF deve proceder-se nos primeiros anos de vida ao rastreio de eventuais lesões orgânicas tendo em vista a terapêutica precoce com hidroxiureia.

- Deve haver atitude de vigilância eficaz em relação aos indicadores de prognóstico e iniciar atempadamente medidas terapêuticas profiláticas disponíveis para reduzir a morbilidade e mortalidade da doença pulmonar e cerebral nos doentes com ACF.

- Torna-se fundamental que no âmbito dos cuidados de saúde primários, os médicos de família e outros profissionais estejam sensibilizados para as manifestações clínicas precoces da anemia de células falciformes e para a prevenção das complicações, na perspectiva do seu encaminhamento precoce para os centros especializados.

A hemoglobina dá a cor ao sangue,
mas muitas vezes de um modo insuficiente ou
com propriedades que lhe são catastróficas,
o que se verifica na Anemia de Células Falciformes.

Meynell, 1914

Resumo

Introdução: A anemia de células falciformes doença hereditária, com repercussão multi-orgânica, tem grande variabilidade na sua expressão clínica. Daí o interesse do estudo de indicadores de prognóstico.

A investigação realizada foi precedida de um resumo histórico incidindo sobre a compreensão de aspectos fundamentais da doença ao longo dos tempos.

Na primeira parte do estudo e após revisão bibliográfica, foram referidos dados da fisiopatologia como base para os estudos que integram a presente dissertação.

Abordou-se o estado da arte relativamente às complicações, aos indicadores de prognóstico e à terapêutica utilizada.

Objectivos: Constituíram objectivos deste estudo realizado numa amostra populacional representativa: identificar as lesões a nível dos sistemas cardio-respiratório e nervoso central, avaliando-se as respectivas repercussões; avaliar a presença de indicadores de prognóstico entre as variáveis seleccionadas; estudar a eficácia e toxicidade da HU nos doentes com as formas graves da ACF.

Para a prossecução destes objectivos foram delineados para além do estudo global três estudos específicos: Estudo 1- repercussão no sistema cardio-respiratório; Estudo 2- repercussão no sistema nervoso central; Estudo 3- terapêutica com hidroxiureia.

Doentes e métodos: Procedeu-se a um estudo prospectivo e multi-institucional durante um período de três anos tendo-se seleccionado para a amostra, e de acordo com critérios pré-definidos, 30 doentes com ACF na fase estável da doença, com idades compreendidas entre os sete e os 18 anos, todos de origem africana à excepção de um caucasiano.

O diagnóstico baseou-se em técnicas de electroforese e estudo molecular que definiu o genotipo da doença e a presença da deleção da α -talassémia assim como os haplotipos da amostra populacional.

Foram utilizadas diferentes metodologias para avaliar a existência de lesão pulmonar e cerebral. Através do estudo estatístico foram seleccionadas diversas variáveis como hipotéticos indicadores de prognóstico.

Estudo 1. Para determinar a existência de lesão a nível pulmonar usaram-se duas metodologias diferentes, a avaliação da função pulmonar com estudo da saturação da Hb em O₂ no sangue arterial e a tomografia computadorizada de alta resolução.

Estudou-se também a possível disfunção cardíaca como repercussão da lesão pulmonar, através do ecocardiograma, e os indicadores de prognóstico com significado estatístico para a lesão encontrada.

Estudo 2. O desenho deste estudo foi sobreponível ao anterior, mas com metodologia adequada para o SNC. Procedeu-se ao estudo das lesões cerebrais por meio de exames imagiológicos, (RMN-CE e DTC) e de testes psicológicos.

Correlacionaram-se as três metodologias utilizadas e a importância de cada uma para a decisão de atitudes terapêuticas preventivas.

Estudo 3. Consistiu num estudo aberto prospectivo não controlado com nove crianças e adolescentes com formas graves de ACF, com o objectivo de avaliar a eficácia da terapêutica com hidroxiureia, durante um período de 24 meses. Todos os doentes completaram no mínimo 15 meses de terapêutica, com uma dose final média de 19 ± 4 mg/K/dia.

Resultados globais: Durante o período anterior à investigação caracterizou-se a amostra populacional estudada quanto ao fenotipo genético, clínico e hematológico de acordo com os critérios utilizados por outros investigadores.

Verificou-se: predomínio do haplotipo Bantu na forma homozigótica em 53% dos doentes; número total de EVO ≥ 3 /ano em 87,5% dos doentes; crises de sequestração em 18,75%; dactilites no primeiro ano de vida em 31,2%; quadro de sépsis grave apenas num doente; crises de hiper-hemólise em 50%; e STA em 59,38% dos doentes.

Quanto ao fenotipo hematológico evidenciaram-se como factores de risco reticulocitose ($13,1 \times 10^3/\mu\text{l}$) e hiperbilirrubinémia (2,5 mg/dl) e como factores de bom prognóstico a presença de deleção de um gene da α -talassémia em 46,9% dos doentes e valor médio de Hb 8,1 g/dl.

Resultados dos estudos parcelares: Estudo 1. Deste estudo infere-se que a DPR ligeira foi diagnosticada em 70% dos doentes, uma vez que as alterações da difusão não foram estatisticamente significativas, o estudo dos gases no sangue não evidenciaram resultados anormais e a TCAR evidenciou alterações em 43,3% dos doentes.

Apenas num doente se verificou doença pulmonar obstrutiva relacionada com maior número da STA.

O estudo da disfunção cardíaca encontrada em 86,7% dos doentes não reflecte a repercussão da DPR a nível cardíaco, podendo estar associada às alterações fisiopatológicas da própria anemia crónica.

Encontraram-se indicadores de prognóstico hematológicos e clínicos. Entre os primeiros, valores de Hb $\geq 8,5$ g/dl e de HbF $\geq 13\%$ foram considerados indicadores de bom prognóstico para a lesão pulmonar. Em relação aos parâmetros clínicos, as STA não foram consideradas indicadoras de prognóstico para a DPR ao contrário do que se verificou com o número de EVO.

Pela análise dos parâmetros genéticos e socio-económicos provou-se a ausência de relação estatisticamente significativa com lesão pulmonar.

Estudo 2. Pela RMN-CE foram diagnosticados ES em 33,3% com uma localização preferencial na substância branca profunda em 26,6% dos doentes.

Relativamente aos parâmetros hematológicos seleccionados, o valor médio da HbF 8,6% constituiu um indicador de bom prognóstico para o aparecimento de ES, enquanto o valor médio de leucócitos $12.39 \times 10^3/\mu\text{l}$ foi considerado um indicador de mau prognóstico.

No estudo do DTC apenas um doente apresentou aumento da velocidade do fluxo cerebral na ACM igual a 196 cm/segundos, associado a vasculopatia grave.

Os testes psicológicos alterados em 80% dos doentes mostraram ser o método mais sensível para detectar alterações do neurodesenvolvimento, mas sem correlação com os ES em 10% dos doentes.

Realça-se a baixa percentagem de DTC patológicos encontrados neste estudo em relação ao número elevado de ES e de testes psicológicos alterados, não se verificando concordância entre os três exames.

Dos indicadores de prognóstico estudados a α -talassémia foi considerada um factor de protecção para o coeficiente de inteligência da escala de Wechsler.

Em relação a parâmetros clínicos estudados os doentes com maior número de EVO, tem em média valores inferiores nos testes psicológicos.

Estudo 3. Neste estudo verificou-se que o valor médio da HbF aumentou significativamente de $7,0 \pm 4\%$ para $13,7 \pm 5,3\%$ ($p=0,028$) ao fim de 15 meses de terapêutica com hidroxiureia.

Clinicamente todos os doentes responderam significativamente com uma redução de 80% no número de EVO, 69% no número de internamentos, 76% no número de dias de hospitalização e 67% no número de transfusões.

Deste modo comprovou-se não só a eficácia desta terapêutica neste grupo pediátrico como também a falta de efeitos secundários significativos.

Considera-se a necessidade de estudos mais prolongados e em grande séries, para com segurança se usar a HU antes que a lesão orgânica se estabeleça, portanto logo nos primeiros anos de vida.

Conclusão: Na amostra populacional estudada foram evidenciadas lesões pulmonares e cerebrais na grande maioria dos doentes que condicionaram a sua qualidade de vida.

Foram identificados indicadores de prognóstico que poderão eventualmente ditar medidas terapêuticas precoces com o objectivo de diminuir a morbilidade e a mortalidade neste grupo etário.

Demonstrou-se que a terapêutica com a HU foi eficaz e bem tolerada.

Summary

Background: Sickle cell anemia (SCA), a hereditary disease characterized by pain and lifetime multi-organic lesion, is a challenge for all that work with carriers of this disease.

The clinical expression variability of SCA is a constant reality and a problem to be solved in the current world of investigation, for which the knowledge of prognostic indicators responsible for the different aspects of clinical evolution diversity will be an added value.

The study is preceded by a historical summary of the most important factors in the evolution of SCA, which are in themselves, an incentive for future research.

In the first part of the study, after an extensive bibliographical revision, physiopathology data is referred to in general and specifically regarding the target organs, that constituted the base for the studies presented in the dissertation.

The state of the art for the complications to be studied, the choice of prognostic indicators and the therapeutics application, were approached for the renewed interest in the theme.

Aims: In regard to the investigation, the objective was to study the lesions in the most affected organs of a chosen pediatric group, to investigate prognostic indicators for lung and cerebral lesions and to evaluate the protective effect of hydroxyurea in children with severe outcomes.

Patients and methods: A prospective and multi-institutional study was carried out during a three-year period, February 1998 to March 2001, with children and adolescents followed up at a Immunohematology Outpatient Clinic of Dona Estefânia's Hospital, Lisbon. Based in predefined criteria, 30 children with SCA were selected in a stable phase of the disease, aged from seven to 18 years old, all of whom were of African origin with exception of one who was Caucasian.

The diagnosis was based on electrophoresis techniques and molecular study that allowed to define the genotype, the presence of deletional alpha-thalassemia as well as haplotypes in the population. Different methodologies were used to evaluate the existence of lung and cerebral lesion. Statistical study of the different variables selected the prognostic indicators. In **Study 1**, to determine the existence of lung

lesion two different methodologies were used: pulmonar function study with arterial blood gases determination; and high resolution computerized tomography.

Heart dysfunction as a repercussion of lung lesion was also studied through echocardiography, and prognostic indicators were statistically significant for lesions found. The design of **Study 2** was similar to Study 1, but with the appropriate methodology for CNS. After neurological examination, which was normal in all patients (control group), cerebral lesions were studied with imagiologic exams (MRN-CE and TCD) and psychological tests.

These three methodologies were correlated and the importance of each one in the decision of the therapeutic profilactic attitudes. **Study 3** consisted of a controlled prospective open study in children with severe forms of SCA, with the aim of the evaluating therapeutic effectiveness of hydroxyurea, during a period of 24 months.

Results: In the global overall study preceding the Studies 1,2 and 3, there were a prevalence of haplotype Bantu (53%) and other risk factors, namely the number of VOC (87,5%), sequestration crisis (18,75%), dactylitis in first year of life(31,2%), hyperhemolysis crisis (50%) and ATC in more than half of the patients (59,38%). This group of bad prognostic indicators, associated with the population of the lower class according to the Graffar scale, demonstrates the importance of primary health care services, information provided to the children and their relatives, as well as the interest in prophylactic therapeutics, specific screening and prenatal diagnosis.

Study 1. It was evident from this study that slight RPD was diagnosed in 70% of the patients, because alterations of the diffusion had no statistical significance and arterial blood gases determinations were normal. Only one patient had restrictive lung disease related with numerous ACS. However ACS was not considered a prognostic indicator for RPD, contrary to the number of EVO. HRTC revealed discreet fibrotic lines that could be related with slight RPD, but the lack of correlation of these two exams (33%) supports the value of lung function tests for precocious diagnosis of RPD.

Heart dysfunction was found in 86,7% of patients, does not reflect the repercussion of RPD, but with the physiopathology of chronic anemia.

Hematologic and clinical prognostic indicators were found. Good prognostic indicators for the non-evolution of RPD with average Hb values of $\geq 8,5$ g/dl and average HbF values of $\geq 13\%$, respectively.

The genetic and social-economic factors had no statistical significance; nevertheless, they were more prevalent among Bantu haplotype (53,3%) in patients with RPD.

Study 2. RMN-CE detected SI in 33,3% of the patients, with preferential location in deep white substance in 26,6% and in front lobe in 20%. This distribution can be related to structural aspects of the brain and with the high sensibility of this organ to hypoxia.

From the hematological parameters selected, average HbF value 8,6% and average leucocyte count $12.39 \times 10^3/\mu\text{l}$ were prognostic indicators with different meaning to SI. The increase in the total bilirubin related to hyperhemolysis clinically explains the genesis of SI

In the TCD study, only one patient had increased cerebral flow speed >196 cm/sec in CMA, which corresponded to serious vasculopathy in AngioMR. This patient never present previously neurological symptoms and had several hyperhemolysis crisis and VOC as risk factors. Low percentage of pathological TCD in this study, in relation to the high number of SI and altered tests, although without correlation among the three exams, is probably attributed to factors related to the methodology, aspects of cerebral physiopathology or perhaps a sign of good prognostic if the duration of study had not been so short. TCD should be used as a screening method in the age groups with higher risk of AVC and should never be considered separately in prophylactic therapeutics indication.

Psychological tests were the most sensitive method to detect neurodevelopment impairment; in 80% of patients the neuropsychological tests were altered, but without correlation with SI (10%). Since SI can become evident during the first two years of life and develop with time, the first psychological tests should be carried out between 3 and 5 years of age to timely be referred to special education and stimulation programs. Prognostic indicators to psychological tests were also found: alpha-thalassemia was found to be a protection factor of the IQ, just as other hematologic factors (hematocrit, MGCV and erythrocytes count). In relation to clinical parameters, although without statistical significance, patients with larger number of VOC had average lower scores versus the average in tests, except in TP. Results from different studies were conclusive as to the type of lesion found and the importance of prognostic indicators. **Study 3.** All the patients completed a minimum of 15 months therapeutic treatment with the final average daily dose of 19 ± 4 mg/kg/day. The average value of the fetal hemoglobin increased significantly from

$7,0 \pm 3,9\%$ to $13,7 \pm 5,3\%$ ($p=0.028$). The HbF average values increased from 6% to 15% after 15 months of therapeutic treatment. Clinically there was a reduction of 80% in the number of VOE, 69% in the number of hospitalization, 76% in the number of days of hospitalization and 67% in the number of transfusions. Once again the effectiveness of this treatment in this pediatric group, as well as the lack of any significant secondary effects, was evident.

The study confirms the need for further detailed research in order to safely effect the appropriate treatment prior to the development of organic lesions, which ideally should be in the first year of life.

Conclusions: These results allow us to clarify the importance of either pulmonary lesions or either nervous central system impairment among patients, children and adolescents, with sickle cell anemia. These lesions were demonstrated in most of the patients studied compromising their quality of life and the mortality.

The treatment with HU is proved to be effective and having low toxicity.

Bibliografia

1. Abel L. Apport de l'épidémiologie génétique pour l'étude de la susceptibilité/résistance au paludisme dans les populations humaines. *Bull Soc Pathol Exot* 1999; 92: 256-60
2. Adams RJ, Nichols FT, McKie V, McKie K, Milner P, Gammal TE. Cerebral infarction in sickle cell anemia: mechanism based on CT and MRI. *Neurology* 1988; 38: 1012-17
3. Adams RJ, Nichols FT, McKie VC, McKie KM, Stephens S, Carl E et al. Transcranial doppler: influence of hematocrit in children with sickle cell anemia without stroke. *J Cardiovasc Technol* 1989; 8: 97-101
4. Adams RJ, Nichols III FT, Aaslid R, McKie VC, McKie K, Carl E et al. Cerebral vessel stenosis in sickle cell disease: criteria for detection by transcranial doppler. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12: 277-82
5. Adams RJ, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang D, McKie K et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 1992; 326: 605-10
6. Adams RJ, Kutlar A, McKie V, Carl E, Nichols FT, Liu Jc, et al. Alfa thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. *Am J Haematol* 1994; 45: 279-82
7. Adams RJ. TCD in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996; 18: 331-6
8. Adams RJ, McKie CV, Brambilla D, Carl E, Gallagher D, Nichols TF et al. Stroke prevention trial in sickle cell anemia. *Contr Clin Trials* 1997; 1: 110-29
9. Adams RJ, McKie VC, Carl M, Nichols FT, Perry R, Brock K et al. Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial doppler. *Am Neurol Assoc* 1997; 42: 699-704
10. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky EP, Pegelow C et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 1998; 339: 5-11
11. Adams RJ. Stroke prevention in sickle cell disease. *Hematol* 2000; 7: 101-5
12. Adams RJ. Lessons from the stroke prevention trial in sickle cell anemia (STOP) study. *J Child Neurol* 2000; 15: 344-9
13. Adams RJ, Pavlakis S, Roach S. Sickle cell disease and stroke: primary prevention and transcranial doppler. *Am Neurol Assoc* 2003;54: 559-63
14. Adekile AD, Yacoub F, Gupta R, Sinan T, Halder MZ, Habeeb Y. Silent brain infarcts are rare in Kuwaiti children with sickle cell disease and high HbF. *Am J Hematol* 2002; 70:228-31
15. Akinola NO, Stevens SME, Franklin IM, Nash GB, Stuart J. Subclinical ischaemic episodes during the steady state of sickle cell anemia. *J Clin Pathol* 1992; 45: 902-6
16. Akinyanju OO, Disu DF, Akinde JA, Adewole TA, Otaigbe AI, Emuveyan EE. Initiation of prenatal diagnosis of sickle cell disorders in Africa. *Prenat Diagn* 1999; 19: 299-304

17. Albers GW, Caplan LR, Easton JD et al. Transient ischemic attack-proposal for a new definition. *N Engl. J Med* 2002; 347: 1713-6
18. Aldrich TK, Dhuper SK, Patwa NS, Makolo E, Suzuka SM, Najeebi AS et al. Pulmonary entrapment of sickle cells: the role of regional alveolar hypoxia. *J Appl Physiol* 1996; 80: 531-9
19. Altura RA, Wang W, Wynn L, Altura B, Altura BE. Hydroxyurea therapy associated with declining serum levels of magnesium in children with sickle cell anemia. *J Pediatr* 2002; 140: 565-9
20. Armstrong FD, Thompson RJ, Wang W, Zimmerman R, Pegelow CH, Miller S et al., and Kerstin Vass for the Neuropsychology Committee of the CSSCD. *Pediatrics* 1996;7(6):864-70
21. Andrew M, Wessel DL. Inhaled nitric oxid in sickle cell disease with acute chest syndrome. *Anesthesiology* 1997; 87: 988-90
22. Andrew LR. Oximetry-Know thy limits. *Chest* 1987. Março; 91: 316
23. Angastiniotis M. Epidemiology. In: Galanelo R, Eleftheriou A, Traeger-Synodinos J, Old J, Petrou M, Angastiniotis M. *Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders*. Nicosia: Thalassaemia International Federation; 2003. 10-23
24. Antonarakis SE, Boehm CD, Serjeant GR, Theisen CE, Dover GJ, Kazazian Jr HH. Origen of the β_s -globin gene in Blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1984; 81: 853-6
25. Aquino SL, Gamsu G, Fahy JV, Claster S, Embury SH, Mentzer WC, Vichinsky EP. Chronic pulmonary disorders in sickle cell disease: findings at thin-section CT. *Radiology* 1994; 193: 807-11
26. Arbane M, Morle L, Dessi E, Rouyer-Fessard P, Morle F, Feingold J et al. Genetic control of the proportion of γ chains of human fetal haemoglobin. *Hematol* 1986: 235-42
27. Armstrong FD, Thompson RJ, Wang W, Zimmerman R, Pegelow CH, Miller S et al. Cognitive functioning and brain magnetic resonance imaging in children with sickle cell disease: Neuropsychology Committee of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics* 1996; 97: 864-70
28. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HUGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 839-45
29. Atz AM, Wessel DL. Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome. *Anesthesiology* 1997; 87: 988-90
30. Ayuo PO, Abinya NAO, Joshi MD, Lore W. Cardiovascular features in adolescents and adults with sickle cell anaemia. *East Afr Med J* 1993; 70: 270-6
31. Bailey K, Morris JS, Thomas P, Serjeant GR. Fetal hemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 1991; 67: 517-20
32. Bain Barbara J. *Haemoglobinopathy Diagnosis*. London: Blackwell Science; 2001

33. Baird RL, Weiss DL, Ferguson AD, French J, Scott R. Clinico-pathological aspects of neurological manifestations. *Pediatrics* 1964; July: 92-100
34. Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr* 1992; 129: 360-6
35. Ballas SK, Marcolina MJ, Dover GJ, Barton FB and al. Multicenter study of hydroxyurea sickle cell anaemia. Erythropoietic activity in patients with sickle cell anaemia before and after treatment with hydroxyurea. *Br J Haematol* 1999; 105: 491-6
36. Barrett-Connor E. Pneumonia and pulmonary infarction in sickle cell anemia. *JAMA* 1973; 224: 997-1000
37. Barsaqui S, Ameer HB, Maherzi A, Queslati A, Bousnina S. Les manifestations cardiaques de la drépanocytose. *Med Tropical* 1992; 52: 187-90
38. Basset P, Beuzard Y, Garel MC, Rosa J. Isoelectric focusing of human hemoglobin: its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. *Blood* 1978; 51: 971-82
39. Batra As, Acherman RJ, Wong W, Wood JC, Chan LS, Ramicone E et al. Cardiac abnormalities in children with sickle cell anemia. *Am J Hematol* 2002; 70: 306-12
40. Baysal E, Huisman THJ. Detection of common deletion thalassemia-2 determinants by PCR. *Am J Haematol* 1994; 46: 208-13
41. Bégue P. Infection et drépanocytose. *Path Biol* 1999; 47: 19-25
42. Bégue P, Castello-Herbretreau B. Infections graves chez l'enfant drépanocytaire: aspects cliniques et prévention. *Arch Pédiatr* 2001; 8: 734-41
43. Bégue P, Castello-Herbretreau. La drépanocytose: de l'enfant à l'adolescent. Prise en charge en 2001. *Bull Soc Pathol Exot* 2001; 94 (2): 85-9
44. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 2000; 96: 2451-9
45. Bellet PS, Kalinyak KA, Shukla R, Gelfand MJ, Rucknagel DL. Incentive spirometry to prevent acute pulmonary complications in sickle cell diseases. *N Engl J Med* 1995; 333: 699-703
46. Benesch RE, Edalji R, Benesch R, Kwong S. Solubilization of hemoglobin S by other hemoglobins. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1980; 77: 5130-4
47. Berchel C, Diara JP, Loret H, Foucan L, Le Turdu C, Samuel Y. Histoire naturelle de la drépanocytose. *Rev Prat* 1992; 42: 1885-91
48. Bernaudin F. Résultats et indications actuelles de l'allogreffe de moelle dans la drépanocytose. *Path Biol* 1999; 47: 59-64
49. Bernaudin F, Verlhac S, Fréard F, Roudot-Thoraval F, Benkerrou M, Thuret I et al. Multicenter prospective study of children with sickle cell disease: radiographic and psychometric correlation. *J Child Neurol* 1999; 15: 333-43

50. Betke K, Marti HR, Schlicht. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature* 1959; 12:1877-8
51. Beuzard Y, De Franceschi L. Experimental therapies for sickle cell disease and β Thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. *Disorders of haemoglobin: genetic, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001:1119-36
52. Bhalla M, Abboud MR, McCloud TC, Shepard JO, Munden MM, Jackson SM et al. Acute chest syndrome in sickle cell disease: CT evidence of microvascular occlusion. *Radiology* 1993; 187: 45-9
53. Bincoletto C, Perlingeiro RCR, Saad STO, Costa FF, Queiroz MLS. Hydroxyurea promotes the reduction of spontaneous BFU-e to normal levels in SS and S/ β thalassemic patients. *Hemoglobin*. 2001; 25: 1-7
54. Binder RE, Mitchell CA, Schoenberg JB, Bouhuys A. Lung function among black and white children. *Am Rev Respir Dis* 1976; 114: 955-9
55. Blaisdell CJ, Goodman S, Clark K, Casella JF, Loughlin GM. Pulse oximetry is a poor predictor of hypoxemia in stable children with sickle cell disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154: 900-3
56. Boros L, Thomas C, Weiner WJ. Large cerebral vessel disease in sickle cell anemia. *J Neurology* 1976; 39: 1236-9
57. Borsboom GJJM, Pelt WV, Quanjer PH. Interindividual variation in pubertal growth patterns of ventilatory function, standing, height, and weight. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1182-6
58. Boyo, Cao, Der Kaloustian, Hercules J, Kulief A, Loukopoulos D et al. Community control of hereditary anemias: memorandum from WHO meeting. *Boletin WHO* 1981; 61: 63-80
59. Boyo, Cao, Der Kaloustian, Hercules J, Kuliev A, Loukopoulos D et al. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. *Bulletin WHO* 1982; 60: 663-90
60. Brás A, Braga LB. Anemia das Células Falciformes. *Arquivos do Hospital de D. Estefânia* 1988; 3 (2/3): 101-13
61. Bromberg PA, Jensen WN. Arterial oxygen unsaturation in sickle cell disease. *Am Rev Respir Dis* 1966; 96: 400-7
62. Brozovic M, Stephens A: Guidelines for the management of sickle cell disease. Adopted in VIth Annual Meeting of the WHO Working Group on Haemoglobinopathies held in Sardinia, April 1989 (revised 1991)
63. Brooks LJ, Koziol SM, Chiarucci KM, Berman BW. Does sleep disordered breathing contribute to the clinical severity of sickle cell anemia? *J Pediatr Hematol Oncol* 1996; 18: 135-9

64. Bulas DI, Jones A, Seibert JJ, Driscoll C, O'Donnell R, Adams RJ. Transcranial doppler screening for stroke prevention in sickle cell anemia: pitfalls in technique variation. *Pediatr Radiol* 2000; 30: 733-8
65. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 762-9
66. Bunn HF. Induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Blood* 1999; 93: 1787-9
67. Byrd SE, Steibert JJ. Transcranial doppler imaging in pediatric abnormalities in older children. *Neuroimaging Clin North Am* 1999; 9: 17-41
68. Carreiro H, Braga L, Gomes da Costa G. Alfa-Talassemia. *Arquivos do Hospital Dona Estefânia* 1989; 4: 41-7
69. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *Blood* 1994; 84: 643-9
70. Castro O. Management of sickle cell disease: recent advances and controversies. *Br J Haematol* 1999; 107: 2-11
71. Castana V. Gigantocytes and sickle cell. *Pediatrics* 1925; 33: 431
72. Ceulaer K, McMullen KW, Maude GH, Keatinge R, Serjeant GR. Pneumonia in young children with homozygous sickle cell disease: risk and clinical features. *Eur J Pediatr* 1985; 144: 255-8
73. Charache S, Scott JC, Charache P: "Acute chest syndrome" in adults with sickle cell anemia. Microbiology, treatment, and prevention. *Arch Intern Med* 1979; 139: 67-9
74. Charache S. Hydroxyurea as treatment for sickle cell anemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5: 571-82
75. Charache S, Dover GJ, Moore RD, Ballas SK, Eckert S, Koshy M et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood* 1992; 79: 2555-65
76. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV et al., and the Investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1317-20
77. Charache S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell in adults. *Semin Hematol* 1997; 34: 15-21
78. Choe HR, Schlegel RA, Rubin E, Williamson P, Westerman MP. Alteration of red cell membrane organization in sickle cell anemia. *Br J Haematol* 1986; 63: 761-73
79. Claster S, Vichinsky EP. First report of reversal of organ dysfunction in Sickle Cell Anemia by the use of Hydroxyurea: Splenic Regeneration. *Blood* 1996; 88: 1951-3
80. Cohen AR. Sickle cell disease - new treatments, new questions. *N Engl J Med* 1998; 339: 42-4

81. Cohen AR, Branch WB, McKie VC, Adams RJ. Neuropsychological impairment in children with sickle cell anemia and cerebrovascular accidents. *Clin Pediatr* 1994; 33: 517-24
82. Combined report on two WHO meetings: The haemoglobinopathies in europe: Brussels: 14/03/86 and Paris 20-21/03/87
83. Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Nijoroge JM, Miller JL, Gladwin MT et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest* 2003; 111: 231-9
84. Cordeiro Ferreira M. Dois casos clínicos de anemia de Cooley. *Lisboa Med* 1938; 15: 24-54
85. Coutinho Gomes MP, Gomes da Costa MG, Braga LB. Alguns dados sobre a Talassémia beta na população hospitalar de Lisboa. *Boletim Clínico dos Hospitais Cívis de Lisboa* 1986; 43: 7-20
86. Coutinho Gomes MP, Gomes da Costa MG, Braga LB, Cordeiro Ferreira NT, Loi A, Pirastu M, Cao A. Beta thalassaemia mutations in the Portuguese population. *Hum Genet* 1988; 78: 13-5
87. Covitz W, Espeland M, Gallagher D, Hellenbrand W, Leff S, Talner N. The heart in sickle cell anemia - the cooperative study of sickle cell disease. *Chest* 1995; 108: 1214-19
88. Craft S, Schatz J, Glauser TA, Lee B, DeBaun MR. Neuropsychologic effects of stroke in children with sickle cell anemia. *J Pediatr* 1993; 123: 712-7
89. Craft JA, Alessandrini E, Kenney LB, Bray G, Luban NLC et al. Comparison of oxygenation measurements in pediatric patients during sickle cell crises. *J Pediatr* 1994; 124: 93-5
90. Crapo RO, Gardner RM. Single breath carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor): recommendations for a standard technique. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1299-307
91. Crapo RO, HanKinson JL, Irvin C, MacIntyre NR, Voter KZ et al. Standarlization of spirometry. 1994 up date. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107-36
92. Davidson JM. Biochemistry and turnover of lung interstitium. *Eur Respir J* 1990; 3: 1048-63
93. Davies SC, Win AA, Luce PJ, Riordan JF. Acute chest syndrome in sickle cell disease. *Lancet* 1984; 36-8
94. Davies SC, Beuzard Y, Borgna-Pignatti C et al. The effect of hydroxyurea in sickle cell disease: a European registry of benefits and toxicity. *Haematology* 1999; 84: PO-0980. (abstract)
95. Davis H, Gergen PJ, Moore RM. Geographic differences in mortality of young children with sickle cell disease in the united states. *Public Health Rep* 1997; 112: 52-58
96. Davis H, Schoendorf KC, Gergen PJ, Moore RM. National trends in the mortality of children with sickle cell disease, 1968 through 1992. *Am J Public Health* 1997; 87: 1317-22

97. De Rycke M, Van de Velde H, Sermon K, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M et al. Preimplantation genetic diagnosis for sickle-cell anemia and for β -thalassemia. *Prenat Diagn* 2001; 21: 214-22
98. Dean D, Neumayr L, Kelly DM, Ballas SK, Kleman K, Robertson S et al. *Chlamydia pneumoniae* in children with acute chest syndrome in patients with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 46-55
99. DeBaun MR, Schatz J, Siegel MJ, Kogy M, Craft S, Resar L et al. Cognitive screening examinations for silent cerebral infarcts in sickle cell disease. *Neurology* 1998; 50: 1678-82
100. Denenberg BS, Criner G, Jones R, Spann, J. Cardiac function in sickle cell anemia. *Am J Cardiol* 1983; 51: 1674-78
101. Dias da Motta PM, Arruda VR, Muscara MN, Saad STO, Nucci G, Costa FF et al. The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anemia. *Br J Haematol* 1996; 93: 333-40
102. Diop S, Thiam D, Cisse M, Toure-Fall AO, Diakhate L. New results in clinical severity of homozygous sickle cell anemia in Dakar, Senegal. *Hematol Cell Ther.* 1999; 41: 217-21
103. Dodé C, Krishnamoorthy K, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematology* 1992; 82: 105-11
104. Dover GJ, Charache S. Hydroxyurea induction of fetal haemoglobin synthesis in sickle cell disease. *Seminars in Oncol* 1992; 19 (Supl 9): 61-6
105. Dover GJ, Brusilow S, Charache S. Induction of fetal haemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood* 1994; 84: 339-43
106. Dover GJ, Platt OS: Sickle Cell Disease. In: Nathan GD, Ordkin SH, Ginsburg D, Look AT. Nathan and Oski's Haematology of Infancy and Childhood. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2003. 790-841
107. Dreyer ZE. Chest infections and syndromes in sickle cell disease of childhood. *Semin Respir Infect* 1996; 11: 163-72
108. Driscoll MC, Hurlet A, Styles L, Files B, Olivieri N, Pegelow C et al. Stroke risk in siblings with sickle cell anemia. *Blood.* 2003; 101: 2401-4
109. Dufillot JK, Ba-Meyo JM, Gahouma D, Kani F. Mortalité des enfants drépanocytaires dans un service de pédiatrie en Afrique Central. *Arch Pédiatr* 1988; 5: 965-9
110. Eichenwald HF. Sickle cell acute chest syndrome associated with parvovirus B19 infection: series and review. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15 : 6
111. Eleftheriou A. Health Education. In: Galanelo R, Eleftheriou A, Traeger-Synodinos J, Old J, Petrou M, Angastiniotis M. Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders. Nicosia: Thalassaemia International Federation; 2003. 24-33
112. El-Hazmi MAF. Clinical and haematological diversity of sickle cell disease in Saudi children. *J Trop Pediatr* 1992; 38: 106-12

113. El-Hazmi MAF, Bahakim HM, Warsy AS, Al-Momen A, Al-Wazzan A, Fawwaz AI et al. Does α_y/α_y ratio and HbF level influence the severity of sickle cell anaemia. *Mol Cell Biochem* 1993; 124: 17-22
114. Emburay SH, Dozy AM, Miller J, Davis JR, Kleman Km, Preisler H et al. Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. *N Engl J Med* 1982; 306: 270-4
115. Emmel VE. A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongate and sickle-shaped red blood corpuscles. *Arch Int Med* 1917; 20: 586-98
116. Emre U, Miller ST, Rao SP, Rao M. Alveolar-arterial oxygen gradient in acute chest syndrome of sickle cell disease. *J Pediatr* 1993; 123: 272-5
117. Emre U, Miller ST, Gutierrez M, Steiner P, Rao SP, Rao M. Effect of transfusion in acute chest syndrome of sickle cell disease. *J Pediatr* 1995; 127: 901-4
118. Esaguy A, Amaro CM, Ribeiro MJ, Gomes PC. Drepanocitose. Um caso clínico de criança com um mês de idade. *Rev Port Pediatr* 1990; 21: 411-3
119. Fabry Me, Kaul DK. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5: 375-98
120. Fan LL, Langston C. Chronic interstitial lung disease in children. *Pediatr Pulmonol* 1993; 16: 184-96
121. Farber MD, Kohy M, Kinney TR. Cooperative study of sickle cell disease: demographic and socioeconomic characteristics of patients and families with sickle cell disease. *J Chron Dis* 1985; 38: 495-505
122. Fauroux B, Muller M, Quinet B, Bégué P. Le poumon drépanocytaire: de l'enfant à l'adulte. *Rev Mal Respir* 1998; 15: 159-68
123. Fauroux B. Détresse respiratoire et drépanocytose. *Arch Pédiatr* 2000; 7: 82-6
124. Faustino P, Gonçalves J, Osório-Almeida L, Romão L, Lavinha J. Contribuição da análise de DNA para a prevenção da β talassémia e da talassodrepanocitose na população residente em Portugal. *Arquivos do Instituto Nacional de Saúde* 1989; 14: 237-43
125. Femi-Pearse D, Gazioglu KM, Yu PN. Pulmonary function studies in sickle cell disease. *J Appl Physiol* 1970; 28: 574-7
126. Ferrone F, Nagel RL. Polymer structure and polymerization of desoxyhaemoglobin S. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. *Disorders of haemoglobin: genetic, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001: 577-610
127. Ferster A, Vermeylen C, Cornu G, Buyse M, Corazza F, Devalck C et al. Hydroxyurea for treatment of severe sickle cell anemia: a pediatric clinical trial. *Blood* 1996; 88: 1960-4
128. Ferster A, Tahiri P, Vermeylen C, Sturbois G, Corazza F, Fondu P et al. Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. *Blood* 2001; 97: 3628-32

129. Files B, Brambilla D, Kutlar A, Miller S, Vichinsky E, Wnag W et al. Longitudinal changes in ferritin during chronic transfusion: a report from the stroke prevention trial in sickle cell anemia (STOP). *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24: 284-90
130. Fitzgerald RK, Johnson A. Pulse oximetry in sickle cell anemia. *Crit Care Med* 2001; 29: 1803-4
131. Flint J, Harding RM, Boyce A, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. In: Rodgers GP, editor. *Sckle cell disease and thalassaemia*. London: Baillière's Clinical Haematology; 1998:2-52
132. Fowler MG, Whitt JK, Lallinger RR, Nash KB, Atkinson SS, Wells RJ et al. Neuropsychologic and academic functioning of children with sickle cell disease. *J Dev Behav Pediatr* 1988; 9: 213-20
133. Francis Jr. RB. Platelets, coagulation, and fibrinolysis in sickle cell disease: their possible role in vascular occlusion. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1991; 2: 341-53
134. Fritsch EF, Lawn RM, Maniatis T. Molecular cloning and characterization of the human beta-like globin gene cluster. *Cell* 1980; 19: 959-72
135. Gacon PH, Donatien Y. Manifestations cardiaques de la drépanocytose. *Presse Médicale* 2001; 30 : 841-5
136. Gaham LM. Sickle cell disease: pulmonary management option. *Pediatr Pulmonol* 2004; 26: 191-3
137. Galateros F. Drépanocytose physiopathologie et diagnostic. *Revue du Patricien* 1995; 43: 351-360
138. Galacteros F. Bases physiopathologiques de la drépanocytose prise en charge et actualité thérapeutiques. *Bull Soc Pathol Exot* 2001; 94: 77-9
139. Gaston M, Ross W. The cooperative study of sickle cell disease: Review of study design and objectives. *J Pediatr Hematol Oncol* 1982; 4: 197-201
140. Gaston M, Smith J, Gallagher D, Flournoy-Gill Z, West S, Bellevue R et al. Recruitment in the cooperative study of sickle cell disease (CSSCD). *Controlled clinical trials* 1987; 8: 131-40
141. Galanelo R. Screening and diagnosis for haemoglobin disorders. In: Galanelo R, Eleftheriou A, Traeger-Synodinos J, Old J, Petrou M, Angastiniotis M. *Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders*. Nicosia: Thalassaemia International Federation; 2003: 34-60
142. Gaultier C, Koch G, Helms P. Measurement of blood gases. *Eur Respir J* 1989; 2: 160-3
143. Gee BE, Platt OS. Sickle reticulocytes adhere to VCAM-1. *Blood* 1995; 85: 268-74
144. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Vichinsky EP et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood* 1995; 86: 776-83
145. Gilman JG, Hisman TH. Two independent genetic factors in the β -globin gene cluster are associated with high C_{γ} -levels in the HbF of SS patients. *Blood* 1984; 64: 452-7

146. Girgis RE, Qureshi MA, Abrams J, Swerdiow P. Decreased exhaled nitric oxide in sickle cell disease: relationship with chronic lung involvement. *Am J Hematol* 2003; 72: 177-84
147. Gladwin MT, Schechter NA, Shelhamer JH, Pannell Lk, Conway DA, Rodgers GP et al. Inhaled nitric oxide augments nitric oxide transport on sickle cell haemoglobin without affecting oxygen affinity. *J Clin Invest* 1999; 104: 937-45
148. Gladwin MT, Rodgers G. Pathogenesis and treatment of acute chest syndrome of sickle cell anaemia. *Lancet* 2000; 355: 1476-8
149. Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B, et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br J Hematol* 2002; 116: 436-4
150. Glover RE, Ivy ED, Orringer EP, Maeda H, Mason RP. Detection of nitrosyl haemoglobin in venous blood in the treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea. *Molecular Pharmacology* 1999; 55: 1006-10
151. Godeau B, Galacteros F, Shaeffer A. Aplastic crises due to extensive bone marrow necrosis and human parvovirus infection in sickle cell disease. *Am J Med* 1991; 91: 557-8
152. Gomes da Costa MG, Cordeiro-Ferreira NT, Tribuna J. Drepanocitose. *Rev Port Ped* 1977; Special issue: 146-77
153. Gonçalves I, Gonçalves J, Périchon B, Osório-Almeida L, Krishnamoorthy R, Lavinha J. A novel mosaic Bantu/Benin/Bantu beta S haplotype found in severe African populations. *Hum Genet* 1994; 94: 101-3
154. Gould GA, Redparth AT, Ryan M, Warren PM, Best JJK, Flenley DC et al. Lung CT density correlates with measurements of airflow limitation and the diffusing capacity. *Eur Respir J*. 1991; 4: 141-6
155. Green NS, Fabry ME, Kaptue-Noche L, Nagel RL. Senegal haplotype is associated with higher HbF than Benin and Cameroon haplotypes in a African children with sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1993; 44: 145-6
156. Graham LM. Sickle cell disease: pulmonary management options. *Pediatr Pulmonol* 2004; 26: 191-3
157. Haddad JD, Joseph JF, Pappas AA. Cytomegalovirus pneumonia in sickle cell disease. *Chest* 1984; 86: 265-6
158. Hagar SW, Vichinsky EP. Major changes in sickle cell disease. *Advances Pediatr* 2000; 47: 249-72
159. Hahn FV, Gillespie EB, Sickle cell anemia. Report of a case greatly improved by splenectomy experimental study of sickle cell formation. *Int Med* 1927; 39: 233-54
160. Hammerman S, Klings ES, Hendra K, Upchurch GR, Rishkof DC, Loscalzo J et al. Endothelial cell nitric oxide production in acute chest syndrome. *Am J Physiol* 1999; 277: 1579-92

-
161. Hankinson JL, Bang KM. Acceptability and reproducibility criteria of the American Thoracic Society as observed in a sample of the general population. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 516-21
 162. Hansell DM. Small vessel disease of the lung: CT-pathologic correlates. *Radiology* 2002; 225: 639-53
 163. Hariman LM, Griffith ER, Hurtig AL, Keehn MT. Functional outcomes of children with sickle-cell disease affected by stroke. *Arch Phys Med Rehabil* 1991; 72: 498-502
 164. Hassell KL, Eckman JR, Lane PA. Acute multiorgan failure syndrome: a potentially catastrophic complication of severe sickle cell pain episodes. *Am J Med* 1994; 96: 155-62
 165. Haupt HM, Moore GW, Bauer TW, Hutchins GM. The lung in sickle cell disease. *Chest* 1982; 81: 332-7
 166. Hebbel RP, Boogaerts MA, Eaton JW, Steinberg MH. Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity. *N Engl J Med* 1980; 302: 992-5
 167. Hebbel RP. Beyond haemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* 1991; 77: 214-37
 168. Helton KJ, Wang CW, Wynn LW, Khan RB, Steen RG. The effect of hydroxyurea on vasculopathy in a children with sickle cell disease. *Am J Neuroradiol* 2002; 23: 1692-6
 169. Henry DM, Ware J, Gradim JM, Hepner SI, McKay J, Weiner M. Echocardiographic measurements in normal subjects. Growth-related changes that occur between infancy and early adulthood. *Circulation* 1978; 57: 278-285
 170. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Int Med* 1910; 6: 517-21
 171. Hibbert ME, Hudson IL, Lanigan A, Landau LI, Phelan PD. Tracking of lung function in healthy children and adolescents. *Pediatr Pulmonol* 1990; 8: 172-7
 172. Higgs D, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Serjeant BE et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle cell disease. *N Engl J Med* 1982; 306: 1441-6
 173. Hillery CA, Du MC, Montgomery RR, Scott JP. Increased adhesion of erythrocytes to components of extracellular matrix: isolation and characterization of a red blood cell lipid that binds thrombospondin and laminin. *Blood* 1996; 87: 4879-86
 174. Hillman BJ. CT screening: who benefits and who pays. *Radiology* 2003; 228: 26-8
 175. Hindmarsh PC, Brozovic M, Brook CGD, Davies SC. Incidence of overt and covert neurological damage in children with sickle cell disease. *Postgrad Med J* 1987; 63: 751-3
 176. Hirsch W, Hiebesh W, Teichler H, Schluter A. Transcranial doppler sonography in children: review of seven-year experience. *Clin Radiol* 2002; 57: 492-7
 177. Homi J, Levee L, Higgs D, Thomas T, Serjeant GR. Pulse oximetry in a cohort study of sickle cell disease. *Clin Lab Haem* 1997; 19: 17-22

178. Hoppe C, Styles L, Vichinsky EP. The natural history of sickle cell disease. *Hematol Oncol* 1998; 10: 49-52
179. Hoppe C, Vichinsky E, Quirolo K, van Warmerdam J, Allen K, Styles L. Use of hydroxyurea in children ages 2 to 5 years with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000 Jul-Aug;22(4):330-4.
180. Hoppe C, Cheng S, Grow M, Silbergleit A, Klitz W, Vichinsky EP et al. A novel multilocus genotyping to identify genetic predictors of stroke in sickle cell anemia. *Br J Haematol* 2001; 114: 718-20
181. Hord J, Byrd R, Stowe L, Windsor B, Smith-Whitley K. *Streptococcus pneumoniae* sépsis and meningitis during the penicillin prophylaxis era in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24: 470-2
182. Huang Z, Louderback JG, King SB, Ballas SK, Kim-Shapiro DB. In vitro exposure to hydroxyurea reduces sickle red blood cell deformability. *Am J Hematol* 2001; 67: 151-6
183. Hurd SS. Lung health study: pulmonary function testing. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1211-3
184. Ibe BO, Morris J, Mills JK, Raj JU. Sickle erythrocytes induce prostacyclin and thromboxane synthesis by isolated perfused rat lungs. *Am J Physiol* 1997; 272: 597-602
185. Inez F, Seixas T, Pacheco P, Lavinha J, Feijó MJ, Martins C et al. Contribuição do rastreio de portadores para a prevenção da β -talassémia e da drepanocitose na população portuguesa: um estudo multicêntrico. *Arq Inst Nac Saúde* 1993; 19: 27-31
186. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 1957; August 17, 180: 326-9
187. Intoh T, Chien S, Usami S. Effects of haemoglobin concentration on deformability of individual sickle cells after deoxygenation. *Blood* 1995; 85: 2245-53
188. Jayabose S, Tugal O, Sandoval C, Patel P, Douglas P, Lin T et al. Clinical and hematologic effects of hydroxyurea in children with sickle cell anemia. *J Pediatr* 1996; 129: 559-64
189. Joneckis BC, Ackley RL, Orringer EP, Wayner EA, Parise LV. Integrin $\alpha 4 \beta 1$, and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. *Blood* 1993; 82: 3548-55
190. Jones AM, Seibert JJ, Nichols FT, Kinder D, Cox K, Luden J et al. Comparison of transcranial color doppler imaging (TCDI) and transcranial doppler (TCD) in children with sickle-cell anemia. *Pediatr Radiol* 2001; 31: 461-9
191. Jonhson LF, Look AT, Gockeman J, Ruggiero MR, Dall-Pizza L, Billings FT. Bone marrow transplantation in a patient with sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1984; 12: 180-3
192. Jonhson WH, McCrary RB, Mankad VN. Transient left ventricular dysfunction in childhood sickle cell disease. *Pediatr Cardiol*. 1999; 20: 221-3
193. Karlsson S. The first steps on the gene therapy pathway to anti-sickling success. *Nat Med* 2000; 6: 139-40

194. Kaul DK, Chen D, Zhan J. Adhesion of sickle cells to vascular endothelium is critically dependent on changes in density and shape of the cells. *Blood* 1994; 83: 3006-17
195. Kaul DK, Fabry ME, Costantini F, Rubin EM, Nagel RL. In vivo demonstration of red cell-endothelial interaction, sickling and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse. *J Clin Invest* 1995; 96: 2845-53
196. Kelly P, Kurtzberg J, Vichinsky EP, Lubin B. Umbilical cord blood stem cells: application for the treatment of patients with haemoglobinopathies. *J Pediatr* 1997; 130: 695-703
197. Key NS, Slungaard A, Dandeleit L, Nelson SC, Moertel C, Styles LA, et al. Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood* 1998; 91: 4216-23
198. Klein C, Baum C. Gene therapy for inherited disorders of haematopoietic cells. *The Hematology J* 2004; 5: 103-11
199. King MA, Bergin CJ, Yeung DWC, Belezouli EE, Olson LK, Ashburn WL et al. Chronic pulmonary thromboembolism: detection of regional hypoperfusion with CT. *Radiology* 1994; 191: 359-63
200. King SB. A role for nitric oxide in hydroxyurea-mediated fetal haemoglobin induction. *J Clin Invest* 2003; 111: 171-2
201. Kinney RT, Helms RW, O'Braski EE, Ohene-Frempong K, Wang W, Daeschner C et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anaemia: Results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. *Blood* 1999; 94: 1550-4
202. Kinney TR, Sleeper LA, Wang WC, Zimmerman RA, Pegelow CH, Ohene-Frempong K et al. Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. *Pediatrics* 1999; 103: 640-5
203. Kirkam FJ, Hewes DKM, Prengler M, Wade A, Lane R, Evans JM. Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease. *Lancet* 2001; 357: 1656-9
204. Kirkpatrick MB, Haynes J. Sickle cell disease and the pulmonary circulation. *Semin Respir Crit Care Med* 1994; 15: 473-81
205. Klein C, Baum C. Gene therapy for inherited disorders of haematopoietic cells. *Hematology J* 2004; 5: 103-11
206. Knight S, Singhal A, Thomas P, Serjeant GR. Factors associated with lowered intelligence in homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 1995; 73: 316-20
207. Knight J, Murphy TM, Browning I. The lung in sickle cell disease. *Estado de Arte. Pediatr Pulmonol* 1999; 28: 205-16
208. Konotey-Ahulu ID. The sickle cell diseases. Clinical manifestations including the "sickle crisis". *Arch Intern Med* 1974; 133: 611-9
209. Koren A, Segal-Kupershmit D, Zalman L, Levin C, Hana MA, Palmor H et al. Effect of hydroxyurea in sickle cell anemia: a clinical trial in children and teenagers with severe sickle cell anemia and sickle cell β -Thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1999; 16: 221-32

210. Koumbourlis AC, Hurlet-Jensen A, Bye MR. Lung function in infants with sickle cell disease. *Pediatr Pulmonol* 1997; 24: 277-81
211. Koumbourlis AC, Zar HJ, Hurlet-Jensen A et al. Prevalence and reversibility of lower airway obstruction in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 2001; 138: 188-92
212. Kress JP, Pohlman AS, Hall JB. Determination of haemoglobin saturation in patients with acute sickle cell chest syndrome. *Chest* 1999; 115: 1316-20
213. Kugler S, Anderson B, Cross D, Sharif Z, Sano M, Haggerty R et al. Abnormal cranial magnetic resonance imaging scans in sickle cell disease. Neurological correlates and clinical implications. *Arch Neurol* 1993; 50: 629-35
214. Kulozik AE, Wainscoat GH, Serjeant GR, Kar BC, Al-Awamy B, Essan GJF et al. Geographic survey of β^S -globin gene haplotypes: evidence for a independent Asian Origin of the sickle cell mutation. *Am J Hum Genet* 1986; 39: 239-44
215. Kwiatkowski JL, Zimmerman R, Greenbaum B, Ohene-Frempong K. Stroke and elevated blood flow velocity in the anterior cerebral artery in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2004; 26(5): 323-6
216. Labie D. Histoire génétique de la drépanocytose. *Rev Prat* E304 1992; 42: 1879-84
217. Labie D, Elion J. Physiopathologie moléculaire et cellulaire de la drépanocytose. *Path Biol* 1999; 47: 7-12
218. Laird L, Dezateux C, Anionwu EN. Neonatal screening for sickle cell disease: what about the carrier infants?. *BMJ* 1996; 313: 407-11
219. Lamy S, Braga LB, Pacheco P, Lavinha J, Gomes da Costa G, Cordeiro Ferreira N. Profilaxia das doenças hereditárias do eritrócito. *Acta Med Port* 1995; 8(6): 355-8
220. Lane PA. Sickle cell disease. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43:639-64
221. Lancios KD, Oner C, Dimovski AJ, Gu C, Huisman TJ. Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the γ^G e γ^A -globin genes of β^S chromosomes with five different haplotypes. *Blood* 1991; 77: 2488-96
222. Lapoumériou C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchep D, Mony-Lobé M, Bodo JM et al. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet* 1992; 89: 333-7
223. Lavinha J , Baiget M. β -thalassémia in Spain and Portugal: epidemiology and molecular pathology 1992. *Hematol Rev*; 6: 113-6
224. Lavinha J, Gonçalves J, Faustino P, Romão L, Osório-Almeida L, Peres MJ et al. Importation route of the sickle cell trait into Portugal: contribution of molecular epidemiology. *Hum Biol* 1992; 64: 891-901
225. Lee A, Thomas P, Cupidore, Serjeant B, Serjeant G. Improved survival in homozygous sickle cell disease: lessons from a cohort study. *BMJ* 1995; 311: 1600-2

-
226. Lee K, Gane P, Roudot-Thoraval F, Godeau B, Bachir D, Bernaudin F et al. The nonexpression of CD36 on reticulocytes and nature red blood cell does not modify the clinical course of patients with sickle cell anemia. *Blood* 2001; 98: 966-8
 227. Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Kulg P, Rida W. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. *Pediatrics* 1989; 84: 500-8
 228. Leone L, Monteleone M. Reverse-phase high-performance liquid chromatography of human haemoglobin chains. *J Chromatography* 1985; 321: 407-19
 229. Leong CS, Stark P. Thoracic manifestations of sickle cell disease. *J Thoracic Imag* 1998; 13: 128-34
 230. Leong MA, Dampier C, Varlotta L, Allen JL. Airway hyperreactivity in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 1997; 131: 278-83
 231. Lester LA, Sodt PC, Hutcheon N, Arcíllia RA. Cardiac abnormalities in children with sickle cell anemia. *Chest* 1990; 98: 1169-74
 232. Liesner R, Mackie I, Cookson J, McDonald S, Chitolie A, Donohoe S et al. Phothrombotic changes in children with sickle cell disease: relationships to cerebrovascular disease and transfusion. *Br J Haematol* 1998; 103: 1037-44
 233. Lonerger GF, Cline DB, Abbondanzo SL. Sickle cell anemia. *Radio Graphics* 2001; 21: 971-94
 234. Lonsdorfer J, Bogui P, Otaeyck A, Bursaux E, Poyart C, Cabannes R. Cardiorespiratory adjustments in chronic sickle cell anemia. *Clin Resp Physiol* 1983; 19: 339-44
 235. Lopez BL, Davis-Moon L, Ballas SK, Ma X-L. Sequential nitric oxide measurements during the emergency department treatment of acute vasoocclusive sickle cell crisis. *Am J Hematol* 2000; 64: 15-9
 236. Lowenthal EA, Wells A, Emanuel PD, Player R, Prchal JT. Sickle cell acute chest syndrome associated with parvovirus B19 infection: case series and review. *Am J Hematol* 1996; 51: 207-13
 237. Lubin BH. Sickle cell disease and the endothelium. *N Engl J Med* 1997; 337: 1623-5
 238. Luzato L, Nwachuku-Jarrett, Reddy S. Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. *Lancet* 1970; 14: 319-21
 239. Lynch AM, Kapila R. Overwhelming postspenectomy infection. *Infect Dis Clin North Am* 1996; 10 (4): 693-707
 240. Maier-Redelsperger M, Montalembert M, Flahault A, Neonato MG, Ducrocq R, Masson MP et al. Fetal haemoglobin and F-cell responses to long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. *Blood* 1998; 91: 4472-9
 241. Maier-Redelsperger M, Labie D, Elion J. Long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 1-7

242. Malinauskas BM, Gropper SS, Kawchak DA, Zemel BS, Ohene-Frempong K, Stallings VA. Impact of acute illness on nutritional status of and young children with sickle cell disease. *J Am Diet Assoc* 2000; 100: 330-4
243. Mallouh AA, Asha M. Beneficial effect of blood transfusion in children with sickle cell syndrome. *AJDC* 1988; 142: 178-82
244. Malouf AJ, Hamrick-Turner JE, Doherty MC, DhillonGS, Yyer RV, Smith MG. Implementation of the STOP protocol for stroke prevention in sickle cell anemia by using duplex power doppler imaging. *Radiology* 2001; 219: 359-65
245. Manodori AB, Barabino GA; Lubin BH, Kuypers FA. Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. *Blood* 2000; 95: 1293-300
246. Manson VR. Sickle cell anemia. *JAMA* 1922; 79: 1318-20
247. Marcus SJ, Kinney TR, Schultz WH, O'Branski EE, Ware RE. Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal haemoglobin (F cells) in children with sickle cell disease. *A J Hematol* 1997; 54: 40-6
248. Marcus SJ, Ware RE. Physiologic decline in fetal haemoglobin parameters in infants with sickle cell disease: implications for pharmacological intervention. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999; 21: 407-11
249. Margolies MP. Sickle cell disease: a composite study and survey. *Medicine* 1951; 30: 357-443
250. Martins MC, Rodrigues MO, Palma MM. Rastreio para as haemoglobinopatias e deficiência em G6PD na comunidade Caboverdiana residente em Lisboa, primeiros resultados (abstrat). In *Symposium on Sickle Cell Disease*. Coelho AM, ed. 1988; Lisbon: National Instituto of Health, 54
251. Martins MC, Olim G, Magalhães HA, Rodrigues MO. Hereditary anemia's in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet* 1993; 30: 235-9
252. Mayo JR, Aldrich J, Muller NL. Radiation exposure at chest CT: A statement of the Fleischner Society. *Radiology* 2003; 228: 15-21
253. McCoy KS, Castile RG, Allen ED, Filbrun DA, Flucke RL, Bar-Yishay E. Functional residual capacity (FRC) measurements by plethysmography and helium dilution in normal infants. *Pediatr Pulmonol* 1995; 19: 282-90
254. Mears JG, Lachman HM, Labie D, Nagel R. α -thalassemia is related to prolonged survival in sickle cell anemia. *Blood* 1983; 62: 286-90
255. Melo, JM. Comentarios acerca de la difusión de la hemoglobina S en Portugal y probablemente en la Península. *Sangre* 1966; 11: 383-94
256. Méndez-Castellano H, and MC Mendez. Estratificación social y humane: método de Graffar modificado. *Arch Venez Puer Pediatr* 1986; 49: 93-104
257. Mercuri E, Faundez JC, Roberts I, Flora S, Bouza H, Cowan F et al. Neurological "soft" signs may identify children with sickle cell disease who are at risk for stroke. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 150-6

-
258. Merkel KHH, Ginsberg PL, Parker JC, Post JD. Cerebrovascular disease in sickle cell anemia: a clinical, pathological and radiological correlation. *Stroke* 1978; 9: 45-52
 259. Merriam EP, Thase ME, Haas GL, Keshavan MS, Sweeney JA. Prefrontal cortical dysfunction in depression determined by Wisconsin card sorting test performance. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 780-2
 260. Miller GJ, Serjeant GR. An assessment of lung volumes and gas transfer in sickle cell anemia. *Thorax* 1971; 26: 309-15
 261. Miller SA, Dykes DD, Polesky. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; 16: 1215
 262. Miller ST, Serjeant GR, Saunders MJ, Michardson C, Gilson RJ. Interpretation of lung function tests in the sickle cell haemoglobinopathies. *Thorax* 1978; 33: 85-8
 263. Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ et al. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 83-9
 264. Miller ST, Macklin EA, Pegelow CH, Kinney T, Sleeper L, Bello J et al. Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the cooperative study of sickle cell disease (CSSCD). *J Pediatr* 2001; 139: 385-90
 265. Miller ST, Wright E, Abboud M, Berman B, Files B, Scher C et al. Impact of chronic transfusion on incidence of pain and acute chest syndrome during the Stroke Prevention Trial (STOP) in sickle cell anemia. *J Pediatr* 2001; 139: 785-9
 266. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J* 1995; 9: 1319-30
 267. Monsaingeon-Lion A, Le Pennec PY, Bridey F, Girard M, Ricard R, Gross E et al. Drépanocytaire homozygote en impasse transfusionnelle: évolution favorable sous hydroxyurée. *Rev Fr Transfus Hémobiol* 1993; 36: 477-84
 268. Montalembert M, Maier-Redelsperger M, Girot R. β -globin cluster haplotype and α -thalassemia do not correlate with the acute clinical manifestations of sickle cell disease in children. *Letter. Blood* 1993; 8: 2595-6
 269. Montalembert M, Belloy M, Bernaudin F, Gouraud F, Capdeville R, Mardini R et al. Three-year follow-up of hydroxyurea treatment in severely ill children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19: 313-8
 270. Montalembert M. L'Hydroxyurée et les autres agents stimulant la synthèse de l'hémoglobine foetale. *Path Biol.* 1999; 47: 55-8
 271. Montalembert M, Begue P, Bernaudin F, Thuret I, Bachir D, Micheau M. Preliminary report of a toxicity of hydroxyurea in sickle cell disease. French Study Group on Sickle cell Disease. *Arch Dis Child* 1999; 81: 437-9
 272. Monteiro C, Rueff J, Falcao AB, Portugal S, Weatherall DJ, Kulozik AE. The frequency and origin of the sickle cell mutation in the district of Coruche/Portugal. *Hum Genet* 1989; 82: 255-8

- 273. Moore CM, Ehlayel M, Leiva LE, Sorensen RU. New concepts in the immunology of sickle cell disease. *Annals of Allergy, Asma e Imunol* 1996; 76: 385-400
- 274. Moran CJ, Siegel MJ, DeBaun MR. Sickle cell disease: imaging of cerebrovascular complications. *Radiology* 1998; 206: 311-21
- 275. Morris C, Vichinsky E, Styles L. Clinician Assessment for acute chest syndrome in febrile patients with sickle cell disease: is it accurate enough? *Annals Emerg Med* 1999; 34: 64-9
- 276. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Sweeters N, Simon J, Vichinsky EP et al. Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *Br J Hematol* 2000; 111: 498-500
- 277. Moser KM, Shea JG. The relationship between pulmonary infarction, cor pulmonale and the sickle states. *Am J Med* 1957; 22: 561-79
- 278. Moser FG, Miller ST, Bello JA, Pegelow CH, Zimmerman RA, Vichinsky EP et al. The spectrum of brain MR abnormalities in sickle-cell-disease: a report from the cooperative study of sickle cell disease. *AJNR* 1996; 17: 965-72
- 279. Mossan BT, Mason R, Gail DB. Advances in molecular genetics, transgenic models, and gene therapy for the study of pulmonary diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 2065-69
- 280. Mueller GA, Eigen H. Pulmonary function testing in pediatric practice. *Pediatr Rev* 1994; 15: 9
- 281. Mukherjee MB, Surve R, Tamankar A, Gangakhedkar RR, Ghosh K, Lu CY et al. The influence of α -thalassaemia on the haematological & clinical expression of sickle cell disease in western India. *Indian J Med Res* 1998; 107: 178-81
- 282. Muller NL, Miller RR. Computed tomography of chronic diffuse infiltrative lung disease. part 1. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1206-15
- 283. Mulvihill D. Application of diagnostic imaging techniques in pediatric pulmonary diseases In: *Pediatric Respiratory Disease: Diagnosis and Treatment* 1993; 1: 73-89
- 284. Murata K, Khan A, Herman PG. Pulmonary parenchymal disease: evaluation with high-resolution CT. *Radiology* 1989; 170: 629-35
- 285. Murteira BJB. Análise exploratória de dados. Estatística descritiva. Lisboa: McGraw-Hill de Portugal; 1999
- 286. Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. *N Engl J Med* 1985;312(14): 880-4
- 287. Nagel RL, Rao SK, Dunda-Belkhodja O, Connolly MM, Fabry ME, Georges A et al. The haematologic characteristics of sickle cell anemia bearing the Bantu haplotype: the relationship between C_γ and HbF level. *Blood* 1987; 69: 1026-30
- 288. Nagel RL, Roth EF. Malaria and red cell genetic defects. *Blood* 1989; 74: 1213-21

289. Nagel RL, Ranney HM. Genetic epidemiology of structural mutations of the β^S -globin gene. *Semin Hematol* 1990; 27: 342-59
290. Nagel RL, Erlingsson S, Fabry ME, Croizat H, Susuka SM, Lachman H et al. The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African-American sickle cell anemia patients. *Blood* 1991; 77: 1371-5
291. Nagel RL, Fleming AF. Genetic epidemiology of the Beta S gene. *Baillière's Clin Haematol* 1992; 5: 331-65
292. Nagel RL. Sickle cell anemia is a multigene disease: sickle painful crises, a case in point. *Am J Hematol* 1993; 42: 96-101
293. Nagel RL, Steinberg MH. Genetics of the β^S gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. *Disorders of haemoglobin: genetic, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001: 711-55
294. Nagel RL. Haemoglobins: normal and abnormal. In: Nathan GD, Ordkin SH, Ginsburg D, Look AT. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2003: 746-74
295. Neel JV. The inheritance of the sickling phenomenon, with particular reference to sickle cell disease. *J Hematol* 1951; VI (5): 389-412
296. Neish AS, Blews DE, Simms CA, Merritt RK, Spinks AJ. Screening for stroke in sickle cell anemia: comparison imaging nad nonimaging US techniques. *Radiology* 2002; 222: 709-14
297. Nestoridi E, Buonanno FS, Jones RM, Krishamoorthy K, Grant PE, Van Cott EM. Arterial ischemic stroke in childhood: the role of plasma-phase risk factors. *Current Opinion Neurol* 2002; 15: 139-44
298. Noguchi CT, Rodgers GP, Serjeant GR, Schechter AN. Levels of fetal haemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1988; 318: 96-9
299. Noll RB, Stith L, Gartstein MA, Ris MD, Grueneich R, Vannatta K et al. Neuropsychological functioning of youths with sickle cell disease: comparison with non-chronically III peers. *J Pediatr Psychol* 2001; 26: 69-78
300. Nsiri B, Gritli N, Mazigh C, Ghazouani E, Fattoum, Machghoul S. Fibrinolytic response to venous occlusion in patients with homozygous sickle cell disease. *Hematol Cell Ther* 1997; 39: 229-32
301. Oakland CH. Acute chest syndrome in sickle cell disease. *Blood* 1994; 860: 219 (abstract)
302. Official Statement of the European Respiratory Society, Standardized Lung Function Testing. Lung volumes and forced ventilatory flow. *Eur Respir J* 1993; 6 (suppl 16): 5-40
303. Official Statement of the American Thoracic Society. Standardization of spirometry. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107-36
304. Oh SO, Ibe BO, Johnson C, Mills JK, Raj JU. Platelet-activation factor in plasma of patients with sickle cell disease in steady state. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 191-6

305. Ohene-Frempong K. Stroke in sickle cell disease: demographic, clinical, and therapeutic considerations. *Semin Hematol* 1991; 28: 213-9
306. Ohene-Frempong K, Horiuchi K, Bulgarelli W. Hydroxyurea increases HbF production in children with sickle cell disease. *Blood* 1993; 82: 472a (abstract).
307. Ohene-Frempong K, Horiuchi K, Stoeckl C et al. Sustained effect of hydroxyurea on HbF production in children with sickle cell disease. XX Annual of the Meeting National. Sickle Cell Disease Program. Boston MA 1995 March 18-21. 215 (abstract)
308. Ohene-Frempong K, Smith-witley K. Use of hydroxyurea in children with sickle cell disease: what comes next? *Semin Hematol* 1997; 34: 30-41
309. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moehr JW et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998; 91: 288-94
310. Ohene-Frempong K, Steinberg MN. Clinical aspects of sickle cell anemia in adults and children. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. *Disorders of haemoglobin: genetic, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001: 611-70
311. Okpala I. Steady-state platelet count and complications of sickle cell disease. *Letter. Hematology J.* 2002; 3 (4):214-5
312. Olivieri NF, Vichinsky EP. Hydroxyurea in children with sickle cell disease: impact on splenic function and compliance with therapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 26-31
313. Óner C, Dimovski AJ, Olivieri NF, Schiliro G, Sodrington J, Fattoum S et al. β^S haplotypes in various world populations. *Hum Genet* 1992; 89: 99-104
314. Ortiz FO, Aldrich TK, Nagel RL, Benjamin LJ. Accuracy of pulse oximetry in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 447-51
315. Oury AP, Hoyoux C, Dresse MF, Chantraine JM. Anémie falciforme chez l'enfant: intérêt de l'hydroxyurée dans les formes graves. *Arch Pédiatr* 1997; 4: 839-44
316. Pagnier J, Mears G, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell haemoglobin gene Africa. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1984; 81: 1771-3
317. Patey RA, Sylvester KP, Rafferty GF, Dick M, Greenough A. The importance of using ethnically appropriate reference ranges for growth assessment in sickle cell disease. *Arch Dis Child* 2002; 87: 352-3
318. Papassotiriou I, Voskaridou E, Stamoulakatou A, Loukopoulos D. Increased erythropoietin level induced by hydroxyurea treatment of sickle cell patients. *Hematol J.* 2000; 1(5): 295-300
319. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle cell disease, a molecular disease. *Science* 1949; 110: 543-6
320. Pavlakis SG, Bello J, Prohovnik I, Sutton M, Ince C, Mohr JP et al. Brain infarction in sickle cell anemia: magnetic resonance imaging correlates. *Ann Neurol* 1988; 23: 125-30

-
321. Pavlakis SG, Prohovnik I, Piomelli S, DeVivo DC. Neurologic complications of sickle cell disease. *Adv Pediatr* 1989; 36: 246-76
 322. Pavlakis SG. Significance of cerebrovascular disease in sickle cell anemia diagnosed by magnetic resonance angiography. *Letter. J Pediatr* 1991; 118: 657-8
 323. Pegelow CH, Adams RJ, McKie V, Abboud M, Berman B, Miller ST, Vichinsky EP et al. Risk of recurrent stroke in patients with sickle cell disease treated with erythrocyte transfusions. *J Pediatr* 1995; 126: 896-9
 324. Pegelow CH, Wang W, Granger S, Hsu L, Vichinsky E, Moser F et al. Silent infarcts in children with sickle cell anemia and abnormal cerebral artery velocity. *Arch Neurol* 2001; 58: 2017-21
 325. Pegelow CH, Macklin EA, Moser FG, Wang W, Bello J, Miller S et al. Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. *Blood* 2002; 99: 3014-18
 326. Peres MJ, Carreiro MH, Machado MC, Seixas T, Picanço I, Batalha L et al. Rastreio neonatal de haemoglobinopatias numa população residente em Portugal 1996; 9(4-6): 135-9
 327. Peters M, Plaat BEC, Cats HT, Wolters HJ, Weening RS, Brandjes DPM. Enhanced trombin generation in children with sickle cell disease. *Thromb Haemost* 1994; 71: 169-72
 328. Petrou M. Genetic Counselling. In: Galanelo R, Eleftheriou A, Traeger-Synodinos J, Old J, Petrou M, Angastiniotis M. *Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders*. Nicosia: Thalassaemia International Federation; 2003: 61-91
 329. Phebus CK, Gloninger MF, Maciak BJ. Growth patterns by age and sex in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 1984; 105: 28-33
 330. Phelan M, Perrine SP, Brauer M, Faller DV. Sickle erythrocytes, after sickling, regulate the expression of the endothelin-1 gene and protein in human endothelial cells in culture. *J Clin Invest* 1995; 96: 1145-51
 331. Pianosi P, D' Souza SJ, Charge TD, Esseltine DE, Coates AL. Pulmonary function abnormalities in childhood sickle cell disease. *J Pediatr* 1993; 122: 366-71
 332. Platt OS, Thorington BD, Bramilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky EP et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* 1991; 325: 11-6
 333. Platt OS, Bramilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994; 330: 1639-44
 334. Platt OS. Easing the suffering caused by sickle cell disease. *N Engl J Med* 1994; 330: 783-4
 335. Platt OS, Falcone JF. Membrane protein interactions in sickle red blood cells: evidence of abnormal protein 3 function. *Blood* 1995; 85: 1992-8
 336. Platt OS. The acute chest syndrome of sickle cell disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1904-7

337. Poillon WN, Kim BC, Labotka RJ, Hicks CU, Kark JÁ. Antisickling effects of 2,3-diphosphoglycerate depletion. *Blood* 1995; 85: 3289-96
338. Poillon WN, Kim BC, Castro O. Intracellular haemoglobin S polymerization and the clinical severity of sickle cell anemia. *Blood* 1998; 91: 1777-83
339. Poncz M, Kane E, Gill FM. Acute chest syndrome in sickle cell disease: etiology and clinical correlates. *J Pediatr* 1985; 107: 861-6
340. Pontual L, Acar P, Montalembert M, Villian E, Maunoury C, Sidi D. L'ischémie myocardiue: une complication méconnue de la drépanocytose chez l'enfant. À propos de deux observations. *Arch Pédiatr* 1999; 6: 178-81
341. Powars DR. Natural history of sickle cell disease-the first ten years. *Semin Hematol* 1975; 12: 267-85
342. Powars DR, Weiss JN, Chan LS, Schroeder WA. Is there a threshold level of fetal haemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia? *Blood* 1984; 63 :921-6
343. Powars DR, Weidman JA, Odom-Maryon T, Niland JC, Johnson C. Sickle cell chronic lung disease: prior morbidity and the risk of pulmonary failure. *Medicine* 1988; 67: 66-76
344. Powars DR. Sickle cell anemia and major organ failure. *Haemoglobin* 1990; 14: 573-98
345. Powars DR, Chan LS, Schroeder WA. β^S -gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical implications. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12: 367-74
346. Powars DR, Chan LS, Schroeder WA. The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. *Semin Hematol* 1990; 27: 360-76
347. Powars DR. β^S -gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and haematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5 (3): 475-93
348. Powars DR. Sickle cell anemia: β^S -gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. *Semin Hematol* 1991; 28: 202-8
349. Powars DR. β^S -Gene-Cluster haplotypes in sickle cell anemia. *Hematol Oncol Clin Nort Am* 1991; 5: 475-7
350. Powars D, Hiti A. Sickle Cell Anemia. β -gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *AIDC* 1993; 147: 1197-202
351. Quantification HbA₂. Cromatografia em coluna. Laboratory methods for detecting haemoglobinopathies 1984. Division of host factors. Center for infections disease. Centers of disease control. Atlanta
352. Quinn CT, Buchanan GR. The acute chest syndrome of sickle cell disease. *J Pediatr* 1999; 135: 416-22
353. Quinn CT, Buchanan GR. Predictors of outcome in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24: 244-5
354. Raison J, Krivitzky A, Bentata-Pessayre M, Volter F, Delzant G. Drépanocytose et fibrose pulmonaire interstitielle diffuse. *Ann Méd Interne* 1981; 132: 540-3

-
355. Rana S, Houston PE, Surama N, Shalaby-Rana EI, Castro OL. Discontinuation of long-term transfusion therapy in patients with sickle cell disease and stroke. *Pediatr* 1997; 131: 757-60
356. Rao SP, Desai N, Miller ST. B19 parvovirus infection and transient aplastic crisis in a child with sickle cell anemia. Concomitant bone marrow/bone infarction and acute chest. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996; 18: 175-7
357. Reed W, Vichinsky EP. New considerations in the treatment of sickle cell disease. *Annu Rev Medicine* 1998; 49: 461-74
358. Regateiro FJ. Glossário de genética. *Brutéria Genética*. 2001; XXII-XCVII: 5-47
359. Regen DM, Graham TP, Wise RKH, Deanfield J, Franklin RCG. Left ventricular cavity dimensions in children with normal and dilated hearts. *Pediatr Cardiol* 1988; 9: 17-24
360. Remy-Jardin M, Remy J, Deffontaines C, Duhamel A. Assessment of diffuse infiltrative lung disease: comparison of conventional CT and high-resolution CT. *Radiology* 1991; 181: 157-62
361. Report of the first two meetings of the WHO/Europea Mediterrane Working Group on Haemoglobinopathies: Brussels, 1986 and Paris, 1987
362. Resar LMS, Segal JB, Fitzpatric LK, Friedmann A, Brusilow SW, Dover GJ. Induction of fetal haemoglobin synthesis in children with sickle cell anemia on low-dose oral sodium phenylbutyrate therapy. *Pediatr Hematol/Oncol* 2002; 24: 737-41
363. Rezai K, Andreasen NC, Alliger R, Cohen G, Swayze V, O'Leary DS. The neuropsychology of the prefrontal cortex. *Arch Neurol* 1993; 50: 636-42
364. Rieder RF, Safaya S, Gillette P, Fryd S, Adams JG, Steinberg MH. Effect of β -globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1991; 36: 184-9
365. Rocha G, Cleto E, Vale L, Pinho L, Coimbra E. Anemia de Células falciforme - revisão de quatro casos. *Nascer e Crescer* 2000; 9: 46-50
366. Rodgers GP, Dover GJ, Noguchi CT, Schechter AN, Nienhuis. Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hidroxyurea. *New Engl J Med* 1990; 322: 1037-45
367. Rodgers GP. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. *Semin Hematol* 1997; 34: 2-7
368. Rogers ZR. Hydroxyurea therapy for diverse pediatric populations with sickle cell disease. *Semin Hematol* 1997; 34: 42-7
369. Rodrigues P, Maltez F, Machado J, Proença R. Traço drepanocítico com nevrite óptica bilateral? Um quadro clínico raro. *Med Interna* 2004; 11(1): 17-22
370. Rosenthal M, Bain SH, Cramer D, Helms P, Denison D, Bush A et al. Lung function in white children aged 4 to 19 years: I-spirometry. *Thorax* 1993; 48: 794-802;

371. Rosse Wf, Narla M, Petz LD, Steinberg MH. New views of sickle cell disease pathophysiology and treatment. *Hematology (Am Soc Haematol Educ Program)*. 2000; 2-17
372. Rucknagel DL. Progress and prospects for the acute chest syndrome of sickle cell anemia. *J Pediatr* 2001; 138: 160-2
373. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1987; 239: 478-91
374. Samuels MP, Stebbens VA, Davies SC, Picton-Jones E, Southall DP. Sleep related upper airway obstruction and hypoxaemia in sickle cell disease. *Arch Dis Child* 1992; 67: 925-9
375. Santoli F, Zerah F, Vasile, Bachir D, Galacteros F, Atlan G. Pulmonary function in sickle cell disease with or without acute chest syndrome. *Eur Respir J* 1998; 12: 1124-9
376. Sarnaik AS, Ballas SK. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia stroke. *Am J Hematol* 2001; 67: 179-82
377. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, Demaria A, Devereux R, Feigenbaum H et al. American Society of Echocardiography Committee on Standards. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echo* 1989; 2: 358-67
378. Schnog JB, Lard LR, Rojer RA, Van der Dijs FPL, Muskiet FAJ, Duits AJ. New concepts in assessing cell disease severity. *Am J Hematol* 1998; 58: 61-6
379. Scott JP, Hillery CA, Brown ER, Misiewicz V, Labotka RJ. Hydroxyurea therapy in children severely affected with sickle cell disease. *J Pediatr* 1996; 128: 820-8
380. Seakins M, Gibbs Wn, Milner PF, Bertles JF. Erythrocyte HbS concentration. An important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 1973; 52: 422-32
381. Seely JM, Effmann EL, Muller NL. High-resolution CT of pediatric lung disease: imaging findings. *A J R* 1997; 168: 1269-75
382. Seibert JJ, Glasier CM, Kirby RS, Allison JW, James CA, Becton DL et al. Transcranial doppler, MRA, and MRI as a screening examination for cerebrovascular disease in patients with sickle cell disease anemia: and 8- year study. *Pediatr Radiol* 1998; 28: 138-42
383. Serjeant GR. Fetal haemoglobin in homozygous sickle cell disease. *Clin Hematol* 1975; 4: 109-22
384. Serjeant GR, Serjeant BE, Desai P, Mason KP, Sewell A, England JM. The determinants of irreversibly sickled cells in homozygous sickle cell disease. *Br J Hematol* 1978; 40: 431-8
385. Serjeant GR, Grandison Y, Lowrie Y, Mason K, Phillips J, Serjeant BE et al. The development of haematology changes in homozygous sickle cell disease: a cohort study from birth to 6 years. *Br J Haematol* 1981; 48: 533-43
386. Serjeant GR. The clinical features of sickle cell disease. *Baill Clin Hematol* 1993; 6: 93-114

-
387. Serjeant GR, Serjeant BE, Thomas PW, Anderson MJ, Patou G, Pattison JR. Human parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. *Lancet* 1993; 341: 1237-40
 388. Serjeant GR, Ceulaer CDE, Lethbridge R, Morris J, Singhal A, Thomas PW. The painful crisis of homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol* 1994; 87: 586-91
 389. Serjeant GR. Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* 1995; 2: 103-8
 390. Serjeant GR, Serjeant B, Stephens A, Roper D, Higgs D, Beckford M et al. Determinants of haemoglobin level in steady-state homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol* 1996; 92: 143-49
 391. Serjeant GR. Sickle cell disease. *Lancet* 1997; 350: 725-30
 392. Serjeant GR, Serjeant BE. Sickle cell disease. Distribution of sickle cell disease. Third edition. New York: Oxford University Press; 2001: 2-30
 393. Serjeant GR, Serjeant BE. Sickle cell disease. The nervous system. Third edition. New York: Oxford University Press; 2001: 339-65
 394. Serjeant GR, Serjeant BE. Sickle cell disease. Pulmonary system. Third edition. New York: Oxford University Press; 2001: 209-227
 395. Setty BNY, Stuart MJ. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood* 1996; 88: 2311-20
 396. Setty BNY, Stuart MJ, Dampier C, Brodecki D, Allen JL. Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *Lancet* 2003; 362: 1450-55
 397. Shamsuddin M, Chen E, Anderson J, Smith L. Regulation of leukotriene and platelet-activating factor synthesis in human alveolar macrophages. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 615-26
 398. Shatz J, Finke RL, Kellett JM, Kramer JH. Cognitive functioning in children with sickle cell disease: a meta-analysis. *J Pediatr Psychol* 2002; 27: 739-49
 399. Sheth S, Shapiro CR, Jensen AH, Piomelli S, Berdon W. Pulmonary embolism developing in patients with sickle cell disease on hypertransfusion and deferoxamine chelation therapy. *Pediatr Radiol* 1997; 27: 926-8
 400. Singer ST, Quirolo K, Nishi K, Hackney-Stephens E, Evans C, Vichinsky EP. Erythrocytapheresis for chronically transfused children with sickle cell disease: An effective method for maintaining a low haemoglobin S level and reducing iron overload. *J Clin Apheresis* 1999; 14: 122-5
 401. Singhal A, Thomas P, Cook R, Wierenga K, Serjeant G. Delayed adolescent growth in homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 1994; 71: 404-8
 402. Smeets M, Brunekreef B, Dijkstra L, Houthuijs D. Lung growth of pre-adolescent children. *Eur Respir J* 1990; 3: 91-6

403. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulation activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997; 337: 8
404. Sprinkle RH, Cole T, Smith S, Buchanan GR. Acute chest syndrome in children with sickle cell disease. *Am J Pediatric Hematol Oncol* 1986; 8: 105-10
405. Sprinkle RH, Hynes DM, Konrad TR. Is universal neonatal haemoglobinopathy screening cost-effective?. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; 148: 461-9
406. Stam H, Beek A VD, Grunbeg K, Stijnen T, Tiddens HAWM, Versprille A. Pulmonary diffusing capacity at reduced alveolar volumes in children. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21: 84-9
407. Steen RG, Langston JW, Ogg RJ, Xiong X, Ye Z, Wang WC. Diffuse T₁ reduction in gray matter of sickle cell disease patients: evidence of selective vulnerability to damage? *Magnetic Resonance Imaging* 1999; 17: 503-15
408. Steen RG, Xiong X, Mulhern RK, Langston JW, Wang WC. Subtle brain abnormalities in children with sickle cell disease: relationship to blood hematocrit. *Ann Neurol* 1999; 45: 279-86
409. Steen RG, Helton KJ, Horwitz EM, Benaim E, Thompson S, Bowman LC et al. Improved cerebrovascular patency following therapy in patients with sickle cell disease: initial results in 4 patients who received HLA-identical haematopoietic stem cell allografts. *Annals of Neurol* 2001; 49: 222-8
410. Steen RG, Emudianughe T, Hankins GM, Wynn LW, Wang W, Xiong X et al. Brain imaging findings in pediatric patients with sickle cell disease. *Radiology* 2003; 228: 216-25
411. Steen RG, Xiong X, Langston JW, Helton KJ. Brain injury in children with sickle cell disease: prevalence and etiology. *Am Neurol Assoc* 2003; 54: 564-72
412. Steinberg B. General and historical reviews. *Arch Pathol* 1929; 21: 876-97
413. Steinberg MH. Determinants of fetal haemoglobin response to hydroxyurea. *Semin Hematol* 1997; 34: 8-14
414. Steinberg NH. Pathophysiology of sickle cell disease. In: Rodgers GP. *Bailliere's Clinical Haematology. Sickle Cell Disease and Thalassaemia*. London: Harcourt Brace Company, 1998; 11 (1): 163-84
415. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1021-3
416. Steinberg MH, Rodgers G. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Semin Hematol* 2001; 38: 299-306
417. Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia. Risk and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* 2003; 289: 1645-51
418. Stettler N, Zemel BS, Kawchak DA, Ohene-Frempong K, Stallings VA. Iron status of children with sickle cell disease. *J Parenteral Enteral Nutrition* 2001; 25 (1): 36-8

-
419. Stevens MG, Maude GH, Beckford M, Grandison Y, Mason K, Taylor B, Serjeant GR et al. α -thalassemia and the hematology of homozygous sickle cell disease in childhood. *Blood* 1986; 67: 411-4
 420. Stockman JA, Nigro MA, Mishkin MM, Oski FA. Occlusion of large cerebral vessels in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1972; 287: 846-9
 421. Strasser BJ. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1999; 286: 1488-9
 422. Stuart MJ, Setty BNY. Sickle cell acute chest syndrome: pathogenesis and rationale for treatment. *Blood* 1999; 94: 1555-60
 423. Studnicka M, Frischer T, Neumann M. Determinants of reproducibility of lung function tests in children aged 7 to 10 years. *Pediatr Pulmonol* 1998; 25: 238-43
 424. Styles LA, Lubin B, Vichinsky EP, Lawrence S, Hua M, Test S et al. Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. *Blood* 1997; 89: 2554-9
 425. Styles LA, Hoppe C, Klitz W, Vichinsky E, Lubin B, Trachtenberg E. Evidence for HLA-related susceptibility for stroke in children with sickle cell disease. *Blood* 2000; 95: 3562-66
 426. Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Heibel RP. Thrombospondin mediates adherence of CD36 sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood* 1992; 80: 2634-42
 427. Sullivan KJ, Goodwin SR, Evangelist J, Moore RD, Mehta P. Nitric oxide successfully used to treat acute chest syndrome of sickle cell disease in a young adolescent. *Crit Care Med* 1999; 27: 2563-8
 428. Sullivan KJ, Nissoon N, Duckworth LJ, Sandler E, Freeman B, Bayne E et al. Low exhaled nitric oxide and a polymorphism in the NOS I gene is associated with acute chest syndrome. *A J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 2186-90
 429. Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra VK. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood* 1998; 92: 3924-35
 430. Sumoza A, Bisotti R, Sumoza D, Fiabanks. Hydroxyurea (HU) for prevention of recurrent stroke in sickle cell anemia (SCA). *Am J Hematol* 2002; 71: 161-5
 431. Sutton LL, Castro O, Cross DJ, Spencer JE, Lewis JF. Pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Am J Cardiol* 1994; 74: 626-8
 432. Swerlick RA, Eckman JR, Kumar A, Jeitler M, Wick TM. $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. *Blood* 1993; 82: 1891-9
 433. Swift AV, Cohen MJ, Hynd GW, Wisenbaker JM, Mckie KM, Makari G et al. Neuropsychologic impairment in children with sickle cell anemia. *Pediatrics* 1989; 84: 1077-85
 434. Sydenstricked VP, Mulherin WA, Husel RW. Sickle cell anemia. Report of two cases in children, with necropsy in one case. *AM J Dis Child* 1923; 26: 132-54

435. Sydenstricked VP. Further observations on sickle cell anemia. *JAMA* 1924; 83: 12-7
436. Sylvester KP, Patey RA, Milligan P, Rafferty GF, Rees D, Greenough A. Pulmonary function abnormalities in children with sickle cell disease. *Pediatr Lung Dis* 2004; 59: 67-70
437. Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z. In vivo production of type 1 cytokines in healthy sickle cell diseases patients. *J Natl Med Assoc* 1999; 91: 619-24
438. Teixeira SM, Cortellazzi LC, Grotto HZW. Effect of hydroxyurea on γ chain fetal haemoglobin synthesis by sickle cell disease patients. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1289-92
439. Thame M, Grandison Y, Mason K, Thomson M, Higgs D, Morris J et al. The red cell distribution width in sickle cell disease is it of clinical value? *Clin Lab Haemat* 1991; 13: 229-37
440. Thomas PW, Higgs DR, Serjeant GR. Benin clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. *J Clin Epidemiol* 1997; 50: 121-6
441. Thomas PW, Singhal A, Hemmings-Kelly M, Serjeant GR. Height and weight reference curves for homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 2000; 82: 204-8
442. Thompson RJ, Gustafson KE, Bonner MJ, Ware RE. Neurocognitive development of young children with sickle cell disease through three years of age. *J Pediatr Psychol* 2002; 27: 235-44
443. Traeger-Synodinos J. New developments in prenatal diagnosis. In: Galanelo R, Eleftheriou A, Traeger-Synodinos J, Old J, Petrou M, Angastiniotis M. *Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders*. Nicosia: Thalassaemia International Fédération; 2003: 121-32
444. Trincão C, Rôlo J. Anemia de Células Falciformes. *Lisboa Médica* 1942; 23: 471-508
445. Trincão C, Almeida Franco LT, Coutinho Gomes MPN, Cordeiro Ferreira N. Hemoglobinas anormais en las provincias ultramarinas portuguesas de Cabo Verde, S. Tomé, Príncipe, Angola y Moçambique. *Sangre* 1958; 3: 51-5
446. Trincão C. Emoglobine anomali loro distribuzione nei territori portoghesi. *Med Clin Sperimentali* 1961; XI: fasc. 5
447. Trincão C, Martins de Melo J, Lorkin PA, Lehmann H. Haemoglobin J Paris in the south of Portugal (Algarve). *Acta Hematol* 1968; 39: 291-8
448. Trudel M, Paepe MED, Chrétien N, Saadane N, Jacmain J, Sorette M et al. Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood* 1994; 84: 3189-97
449. Tsevat J, Wong JB, Pauker SG, Steinberg MH. Neonatal screening for sickle cell disorders: a cost-effectiveness analysis. *J Pediatr* 1991; 118: 118-546
450. Ulrik CS, Ba cker V. Markers of impaired growth of pulmonary function in children and adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 40-4

-
451. Valadas P, Trincão C, Martins de Melo J. Considerações sobre a microdrepanocitose. Associação Talassemia-Drepanocitoses em duas famílias alentejanas. Boletim Clínico dos Hospitais Cívicos de Lisboa 1964; 28: Números 1/4
 452. Valadas Preto R, Simões de Carvalho M, Graça F, Batista AM, Pérez Fernández MA, Nogueira AR et al. Estudo sobre a anemia da drepanocitose. Jornal da Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa 1980; Tomo CXLIV 2/3: 87-153
 453. Valafar H, Valafar F, Darvill A, Albersheim P, Kutlar A, Woods KF et al. Predicting the effectiveness of hydroxyurea in individual sickle cell anemia patients. Artificial intelligence in Med 2000; 18: 133-48
 454. Varat MA, Adolph RJ, Fowler NO. Fundamentals of clinical cardiology. Am Heart Journal 1972; 83: 415-26
 455. Vassel H, Ferrão A, Morais A. Doença das células falciformes - Análise retrospectiva (1982-1997). Acta Pediatr Port 1999; 30: 391-5
 456. Vegfors M, Lingberg LG, Lennmarken C. The influence of changes in blood flow on the accuracy of pulse oximetry in humans. Acta Anaesthesiol Scand 1992; 36: 346-9
 457. Vermynen C. Bone marrow transplantation in sickle cell anaemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. Disorders of haemoglobin: genetic, pathophysiology, and clinical management. Cambridge: Cambridge University Press; 2001:1073-83
 458. Vichinsky EP. Comprehensive care in sickle cell disease: its impact on morbidity and mortality. Semin Hematol 1991; 28: 220-6
 459. Vichinsky E. Transfusion therapy. In: Stephen HE, Robert PH, Narla PH, Martin HS. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. New York: Raven Press; 1994. 781-94
 460. Vichinsky EP, Lubin BH. A cautionary note regarding hydroxyurea in sickle cell disease. Blood 1994; 83: 1124-8
 461. Vichinsky EP, Styles L. Pulmonary complications. Hematol Oncol Clin North Am 1996; 10: 1275-87
 462. Vichinsky EP, Serjeant GR. Understating the morbidity of sickle cell disease. Br J Haematol 1997; 99: 974-82
 463. Vichinsky EP. Hydroxyurea in: present and future. Semin Hematol 1997; 34: 22-9
 464. Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute chest syndrome in sickle cell disease; clinical presentation and course. Blood 1997; 89: 1787-92
 465. Vichinsky EP, Styles L. Hydroxyurea and fetal haemoglobin modulators. Hematol Oncol 1999; 22: 42-45
 466. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles NA, Williams R, Lennette E, Dean D et al. Causes and outcomes of acute chest syndrome in sickle cell disease. N Engl J Med 2000; 342: 1855-65
 467. Vichinsky EP. New therapies in sickle cell disease. Lancet 2002; 360: 629-31

- 468. Vichinsky EP. Pulmonary hypertension in sickle cell disease. *New Engl J Med* 2004; 350: 857-9
- 469. Wajeman H, Galacteros F. Drépanocytose: laboratoire et étude de l'haémoglobine. *Bull Soc Pathol Exot* 2001; 94 : 80-4
- 470. Wajima T, Kraus AP. Leukocyte alkaline phosphatase in sickle cell disease. *N Engl J Med* 1975; 293: 918-19
- 471. Walker BK, Brownstein PK, Burka. The diagnosis of pulmonary tromboembolism in sickle cell disease. *Am J Hematol* 1979; 7: 219-32
- 472. Wall Ma, Platt OS, Strieder DJ. Lung function in children with sickle cell anemia. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120: 210-4
- 473. Walters MC, Stob R, Patience M, Leisenring W, Taylor T, Sanders J et al. Impact of bone marrow transplantation for symptomatic sickle cell disease: an interim report. *Blood* 2000; 95: 1918-24
- 474. Wang WC, Langston JW, Steen RG, Wynn L, Mulherm R, Wilimas J et al. Abnormalities of the central nervous system in very young children with sickle cell anemia. *J Pediatr* 1998; 132: 994-8
- 475. Wang WC, Gallangher DM, Pegelow CH, Wright E, Vichinsky E, Abboud M et al. Multicenter comparison of magnetic resonance imaging transcranial doppler ultrasonography in the evaluation of the central nervous system in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22: 335-9
- 476. Wang WC, Enos L, Gallagher D, Thompson R, Guarini L, Vichinsky E et al. Neuropsychology performance in school-aged children with sickle cell disease: a report from the cooperative study of sickle cell disease. *J Pediatr* 2001; 139: 391-7
- 477. Wang WC, Wynn LW, Rogers ZR, Scott JP, Lane PA, Ware RE. A two-year pilot trial of hydroxyurea in very young children with sickle-cell anemia. *J Pediatr* 2001; 139: 790-6
- 478. Wang WC, Helms RW, Lynn HS, Lallinger RR, Gee BE, Obene-Frempong K et al. Effect of hydroxyurea on growth in children with sickle cell anemia: Results of the HUG-KIDS Study. *J Pediatr* 2002; 140: 225-9
- 479. Wang X, Dockery DW, Wypij D, Gold DR, Speizer FE, Ware JH et al. Pulmonary function growth velocity in children 6 to 18 years of age. *Pediatr Pulmonol* 1993; 148: 1502-8
- 480. Wang X, Seaman C, Paik M, Chen T, Bank A, Piomelli S. Experience with 500 prenatal diagnoses of sickle cell diseases: the effect of gestational age on affected pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 1994; 14: 851-7
- 481. Ware RE, Steinberg MH, Kinney TR. Hydroxyurea: an alternative to transfusion therapy for stroke in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1995; 50: 140-3
- 482. Ware RE, Zimmerman AS, Schultz WH. Hydroxyurea as an alternative to blood transfusion for the prevention of recurrent stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 1999; 94: 3022-6

-
483. Wasserman AL, Wilimas JA, Fairclough DL, Mulhern RK, Wang WC. Subtle neuropsychological deficits in children with sickle cell disease. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13: 14-20
 484. Watkins KE, Hewes DK, Connelly A, Kendall BE, Kingsley DP, Evans JE et al. Cognitive deficits associated with frontal-lobe infarction in children with sickle cell disease. *Dev Med Child Neurol* 1998; 40: 536-43
 485. Watson J, Stahman AW, Bilello FP. The significance of the paucity of sickled cells in newborn negro infants. *Am J Med Sci* 1948; 215: 419-
 486. Wautier JL. Endothélium et drépanocytose ou comment la mutation d'un acide aminé perturbe la circulation sanguine. *Rev Praticien* 1999; 49: 121-3
 487. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Genetics* 2001; 2: 245-55
 488. Weil JV, Castro O, Malik AB, Rodgers G, Bonds DR, Jacobs TP. Pathogenesis of lung disease in sickle haemoglobinopathies. NHLBI workshop summary. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 249-56
 489. West DC, Andrada E, Azari R, Rangaswami AA, Kuppermann N. Predictors of bacteremia in febrile children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24: 279-83
 490. West JB. Pulmonary pathophysiology. The essentials. Fifth edition. Baltimore: William & Wilkins; 1997
 491. West MS, Wethers D, Smith J, Steinberg M. Laboratory profile of sickle cell disease: a cross-sectional analysis. *J Clin Epidemiol* 1992; 45(8): 893-909
 492. Westerman MP, Puchulu E, Schlegel R, Salameh M, Williamson P. Intracellular Ca^{2+} containing vesicles in sickle cell disorders. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 416-20
 493. Wethers DI. Sickle cell disease in childhood: Part II. Diagnosis and treatment of major complications and recent advances in treatment. *Am Fam Physician* 2000; 62: 1309-14
 494. White DA, DeBaun M. Cognitive and behavioral function in children with sickle cell disease: a review and discussion of methodological issues. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 458-62
 495. White DA, Salorio CF, Schatz J, DeBaun M. Preliminary study of working memory in children with stroke related to sickle cell disease. *J Clin Exp Neuropsych* 2000; 22: 257-64
 496. Wilimas J, Golf JR, Anderson HR, Langston JW, Thompson E. Efficacy of transfusion therapy for one to two years in patients with sickle cell disease and cerebrovascular accidents. *J Pediatr* 1980; 96: 205-8
 497. Williams D, Mateer CA. Developmental impact of frontal lobe injury in middle childhood. *Brain and Cognition* 1992; 20: 196-204
 498. Williams GD, Toro-Figueros LO. Multiple organ system failure: a continuous of multiple organ dysfunction syndrome. In *essentials of pediatric intensive care*. 2nd ed. Levin DL, Morris FC editors. Churchill Livingstone; 1997: 302-12

499. Wiznitzer M, Masaryk TJ. Cerebrovascular abnormalities in pediatric stroke: assessment using parenchymal and angiographic magnetic resonance imaging. *Am Neurol* 1991; 29: 585-9
500. Wood DH. Cerebrovascular complications of sickle cell disease. *Stroke* 1978; 9: 73-5
501. World Health Organization. Community control of hereditary anaemias. Memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the WHO* 1983; 61: 63-80
502. Wright J, Thomas P, Serjeant Gr. Septicemia caused by salmonella infection : An overlooked complication of sickle cell disease. *J Pediatr* 1997; 130: 394-9
503. Wun T, Paglieroni T, Rangaswami A, Franklin PH, Welborn, Cheung A et al. Platelet activation in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* 1998; 100: 741-9
504. Yarbro JW. Mechanism of action of hydroxyurea. *Seminars in Oncol* 1992; 19 (Suppl 9): 1-10
505. Yater WM, Hansmann GH. Sickle cell anemia: A new cause of cor pulmonale of right heart failure. *Am J Med Sci* 1936; 191: 474
506. Zago MA, Silva WA, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C et al. Atypical β^S haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol* 2000; 63: 79-84
507. Zarkowsky HS, Gallagher D, Gill FM, Wang WC, Wang JM, Lande WM et al. Bacteremia in sickle haemoglobinopathies 1986; 109 (4): 579-85
508. Zimmerman SA, Shultz WH, Davis JS, Pickens CV, Mortier NA et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. *Blood* 2004; 103: 2039-45

ANEXOS

CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

Nome do doente (letras maiúsculas): _____

Data de nascimento: __ / __ / ____ Proc. Nº _____ Data __/__/__

Declaro que o meu filho pode participar no estudo clínico: Função Pulmonar em Crianças com ACF.

Fui informado em detalhe e de uma forma compreensiva pela Dr^a Lúgia Barbosa Braga sobre os seguintes pontos:

A natureza, significado e objectivos do estudo clínico, possíveis riscos e inconvenientes e as condições que temos de aceitar. Além disso, li e compreendi o protocolo do doente e esta folha de consentimento. As questões que surgiram foram respondidas pelo investigador com clareza e com o detalhe suficiente.

Aceito os preceitos médicos requeridos para a participação neste estudo clínico, mas tenho o direito de retirar a participação do meu filho no estudo em qualquer momento, sem que daí advenham quaisquer desvantagens para ele.

Concordo que os dados médicos obtidos no decorrer deste estudo possam ser documentados e transferidos.

Recebi uma cópia deste consentimento. O original ficará na posse do investigador.

Local e data

Nome e assinatura do(s) pai(s) ou representante legal

Local e data

Nome e assinatura do(s) pai(s) ou representante legal

DECLARAÇÃO DE AUSÊNCIA DE CONFLITO DE INTERESSES

Este estudo teve o apoio nomeadamente no âmbito do suporte bibliográfico e da elaboração de exames complementares de investigação das seguintes empresas:

Glaxo-Smith-Kline, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, Roche, Nestlé, Esteve Farma e Ferraz Lynce.

Tal apoio foi propiciado na ausência de qualquer tipo de contrapartidas na sua atribuição, de qualquer tipo de compromisso entre o investigador e as referidas empresas as quais não têm interesses directos na área de investigação desta Dissertação.

1. FICHA DE REGISTO DE DADOS REFERENTES À DISSERTAÇÃO

Identificação			
Nº Processo: _____ Nº Protocolo: _____ Data do Protocolo: ____/____/____			
Nome: _____ Apelido: _____ Data de Nascimento: ____/____/____			
Origem: Caucasiana <input type="checkbox"/> Africana <input type="checkbox"/> Asiática <input type="checkbox"/>		Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/>	
Naturalidade: _____			
Residência: _____		Contacto: _____	
História Familiar			
Naturalidade Pai: _____			
Naturalidade Mãe: _____			
<u>Antecedentes Familiares:</u>			
Pai _____			
Mãe _____			
Irmãos _____			
Informações Gerais			
Data do diagnóstico: ____/____/____ Pré-natal <input type="checkbox"/> Familiar doente <input type="checkbox"/> Complicação _____			
Genotipo: _____ Haplótipo: _____ Delecções alfa: _____			
Fenotipo hematológico: Hb SS _____ Hb A ₂ _____ Hb F _____ G _γ /A _γ _____ %G _γ _____			
Fenotipo Clínico			
	1º Ano	2º Ano	3º Ano
EVO			
STA			
AVC			
Infecções Graves			
Sequestração			
Aplasia			
Outros			
Transfusões (reações; T. quelante)			
Aparelho Respiratório			
Clínica: Infecções respiratórias _____ Asma _____ Outras _____			
Função respiratória: _____			
Gasometria: PaO ₂ _____		Sat. O ₂ _____	
Rx de tórax; TCAR: _____			
Electrocardiograma: _____			
Ecocardiograma: _____			

Sistema Nervoso Central						
Clínica: Período neonatal _____ Convulsões _____ Outras _____						
Exame neurológico _____						
Testes psicológicos _____						
RMN-CE _____						
Doppler transcraniano _____						
Parâmetros Laboratoriais (6/6 meses)						
Data						
Hb (g/l)						
Hb F (%)						
Eritrocitos (/mm ³)						
VGM (fl)						
HGM (pg)						
CMHG (g/dl)						
Reticulócitos (x10 ⁶ /ml)						
Linfócitos (x10 ³ /ml)						
Neutrófilos (x10 ³ /ml)						
Plaquetas (x10 ³ /ml)						
AST (UI/l)						
ALT (UI/l)						
F. alcalina (mg/dl)						
Bilirrubina T. (mg/dl)						
Bilirrubina Ind. (mg/dl)						
T. protrombina (%)						
Ureia (mg/dl)						
Creatinina (mg/dl)						
LDH (mg/dl)						
PCR (mg/dl)						
Ferritina (ng/ml)						
Urina II						

2. FORMULÁRIO HIDROXIUREIA

Identificação	
Nº do processo: _____	Data de nascimento: ____ / ____ / ____
Nome: _____	Naturalidade: _____
Raça: Caucasiana <input type="checkbox"/> Africana <input type="checkbox"/> Asiática <input type="checkbox"/>	Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/>
Ancestrais ou origens geográficas: _____	

Informações Gerais	
1ª observação: ____/____/____ (a)	Idade no início da hidroxiureia _____
Início Hidroxiureia: ____/____/____ (b)	Dose máxima de hidroxiureia _____
Fim Hidroxiureia: ____/____/____ (c)	Dia da dose máxima de hidroxiureia _____

Parâmetros Clínicos (internamentos por episódios vasocclusivos)					
Duração observação pré-tratamento (b-a) ____			Duração observação pós-tratamento (c-b) ____		
Tipo*	Dias de internamento	Nº transfusões	Tipo	Dias de internamento	Nº transfusões

*episódio doloroso, síndrome torácico agudo, acidente vascular cerebral

Efeitos Secundários					
Naúseas <input type="checkbox"/>	Diarreia <input type="checkbox"/>	Febre <input type="checkbox"/>	Rash <input type="checkbox"/>		
Vômitos <input type="checkbox"/>	Obstipação <input type="checkbox"/>	Convulsões <input type="checkbox"/>	Prurido <input type="checkbox"/>		
Estomatite <input type="checkbox"/>	Cefaleias <input type="checkbox"/>	Alucinações <input type="checkbox"/>	Disúria <input type="checkbox"/>		
Anorexia <input type="checkbox"/>	Alopecia <input type="checkbox"/>	Hemorragias <input type="checkbox"/>	Cólica renal <input type="checkbox"/>		

Observações

RESUMOS DE COMUNICAÇÕES RELACIONADAS COM A DISSERTAÇÃO

1. ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES. REPERCUSSÃO NO NEURO-DESENVOLVIMENTO

L Braga ¹, F Candeias ¹, L Caeiro ², E Calado ², J Duarte ³, J Ribeiro ⁴.

¹ Unidade de Imuno-Hematologia e ² Neuropediatria – Hospital Dona Estefânia,

³Centro de Ressonância Magnética - Caselas e ⁴ Serviço de Medicina – Hospital São José.

Congresso Científico dos Hospitais Cívicos de Lisboa. Lisboa, Novembro de 1999.

Introdução: As crianças com anemia de células falciformes (SS) têm um risco elevado de neurovasculopatia. A vasculopatia cerebral é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade da doença e carece de um diagnóstico precoce. Clinicamente manifesta-se de um modo insidioso, os infartos silenciosos, a diminuição da função cognitiva e predispõe os doentes para formas mais graves, os acidentes vasculares cerebrais (AVC).

Objectivo: Avaliar sob o ponto de vista imagiológico e do neurodesenvolvimento, um grupo de crianças com anemia de células falciformes.

Doentes e Métodos: Estudámos uma amostra aleatória de 22 crianças com anemia de células falciformes (SS) seguidas na consulta de Imuno-Hematologia do Hospital Dona Estefânia com idades entre os sete e 16 anos de origem africana.

O diagnóstico foi baseado na eletroforese das hemoglobinas determinada pela focagem isoelétrica, doseamento de HbF pelo método de Betke e estudo molecular para caracterização do haplotipo.

Vinte doentes estavam em período assintomático e sem alterações neurológicas apenas dois estavam em regime de transfusão regular por terem tido AVC anteriores.

Na avaliação incluiu-se o exame neurológico sempre feito pelo mesmo neurologista, a ressonância magnética nuclear crânio-encefálica (RMN-CE), com equipamento de alto campo magnético 1.5T, o doppler transcraniano com um transdutor doppler pulsante de 2 Mhz, e um conjunto de 5 testes psicológicos para avaliar a atenção (T.P.), o raciocínio lógico-abstracto (M.P.R. e M.P.R.-C), a inteligência (W.I.S.C.-R), a capacidade visuoespacial (Bender) e a perseveração (W.C.S.T.).

Os resultados dos testes psicológicos foram comparados com um grupo testemunha de 11 crianças saudáveis e do mesmo grupo etário selecionadas entre os familiares e amigos dos doentes.

Resultados: O estudo só termina em meados de Agosto pelo que os resultados preliminares ainda não estão disponíveis e enviar-se-ão oportunamente. No entanto o estudo anterior com 11 destas crianças com anemia de células falciformes revelou associação entre o estudo imagiológico dos infartos silenciosos através da RMN-CE e a avaliação do neurodesenvolvimento através dos testes psicológicos.

Conclusão: Se forem confirmados os resultados anteriores os testes psicológicos e o doppler transcraniano poderão vir a constituir testes preditivos dos AVC como forma de diagnóstico precoce e de uma terapêutica atempada.

2- FACTORES DE RISCO PARA OS EPISÓDIOS VASO-OCCLUSIVOS EM CRIANÇAS COM ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES

L Braga¹, I Correia³, A Miranda³, I Picanço³, MT Seixas³, I Ferreira², T Santos², HA Santos², T Rosário², F Nogueira², I Griffe², A Viveiros², P Nogueira⁴

¹ Serviço de Imuno-Hematologia e ² Serviço de Patologia Clínica-Hospital de Dona Estefânia – Lisboa, ³ Laboratório de Hematologia e ⁴ Observatório Nacional de Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge- Lisboa.

Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia. Évora, Novembro de 2002.

Introdução: Na anemia de células falciformes (SS), os característicos episódios vaso-oclusivos dolorosos (EVO) são responsáveis pela lesão multi-órgão e, deste modo, prognóstico da morbilidade e mortalidade da doença. Devido a uma única mutação génica, a diversidade das manifestações clínicas variam: de uma criança para a outra; na mesma criança; e, em momentos diferentes, a doença manifesta-se com aspectos variados. O conhecimento desta variabilidade do fenotipo entre as crianças com a mutação da β -globina é uma das chaves para a compreensão da fisiopatologia da SS. A sua expressão clínica traduz-se por uma anemia crónica grave mas bem tolerada, e por fenómenos vaso-oclusivos subclínicos ou enfartes isquémicos abertos responsáveis por dor ligeira a excruciante. A identificação dos diversos factores que influenciam a expressão clínica conduz a um melhor conhecimento da história natural da anemia de células falciformes.

O fibrinogénio aumenta a aderência dos eritrócitos falciformes ao endotélio no início da vaso-oclusão. Os níveis do fibrinogénio e dos lípidos são factores de risco isolados para doença arterial periférica e para os acidentes vasculares cerebrais

(AVC). A associação dos vários polimorfismos do fibrinogénio com os níveis séricos é controversa.

Objectivos: Propomo-nos avaliar alguns factores de risco tais como os níveis plasmáticos do fibrinogénio e 4 polimorfismos, parâmetros hematológicos e dados bioquímicos que possam modular o fenotipo da SS.

Material e Métodos: A amostra é constituída por 34 crianças com SS seguidas na Consulta de Imuno-Hematologia do Hospital. D. Estefânia, sendo 16 do sexo feminino e 18 do sexo masculino com idades compreendidas entre os sete e 18 anos (média de 155,84 meses), predominantemente de origem africana. Três destas crianças estavam em regime transfusional regular por terem tido AVC anterior. Durante o período de estudo de três anos, realizado na fase estável da doença, dividiram-se as crianças em dois grupos, baseados no número de EVO (menos de 2 EVO/ano; 2 ou mais EVO/ano).

O diagnóstico da SS foi efectuado segundo parâmetros hematológicos e confirmação molecular. Avaliaram-se os índices de gravidade (I.G.) tendo como base os critérios de El-Hazmi.

Foram analisados: os parâmetros hematológicos obtidos em contador automático; o fibrinogénio por método de Clauss; o estudo dos lipídeos por métodos enzimáticos, sendo o HDL por método directo e o LDL pela formula de Friedwald; o doseamento da HbF foi realizado pelo método de Betke e os 4 polimorfismos do fibrinogénio por RFLPs (restriction fragment length polymorphism).

Resultados e Discussão: Verifica-se que no sexo feminino predomina o grupo correspondente ao maior número de EVO e que existe uma correlação entre o I. G. e o número de EVO em ambos os sexos.

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($P=0.05$) nos polimorfismos estudados - Hind III, Bcl I, Ava II e Mnl I – entre os dois grupos de crianças, incluindo os três casos de AVC.

A análise estatística dos parâmetros hematológicos e valores bioquímicos nos dois grupos de crianças, através do teste t de Student para amostras independentes, apresentou valores limítrofes de significância estatística para os seguintes parâmetros: nº de reticulócitos ($p=0,060$); leucócitos ($p=0,062$); ALP ($p=0,062$) e GGT ($p=0,087$). Detectaram-se diferenças significativas nos níveis de bilirrubina directa ($p=0,039$), AST ($p=0,014$) e ALT ($p=0,011$).

Estes resultados foram influenciados pela pequena dimensão da amostra, pelo que requerem estudos mais alargados.

Conclusões: A amostra de crianças SS estudadas, com várias origens geográficas, apresenta um predomínio de formas moderadas da anemia de células falciformes. A identificação de factores de risco laboratoriais e bioquímicos na base de marcadores

da doença isoladamente é pouco precisos. Um conhecimento precoce da anemia de células falciformes, permite a instituição de uma terapêutica atempada. É necessário o conhecimento de um conjunto de factores que nos assegurem que os riscos do tratamento sejam compatíveis com os riscos da gravidade da doença.

3 - DOENÇA CEREbroVASCULAR NA ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES

E Calado ¹, L Braga ², F Candeias ², L Caeiro ², J Duarte ³, J Ribeiro ⁴

¹ Serviço de Neurologia Pediátrica e ² Unidade de Imuno-Hematologia do Hospital Dona Estefânia, Lisboa; ³ Centro de Ressonância Magnética de Caselas, Lisboa; ⁴Serviço de Medicina, Hospital S. José, Lisboa.

Congresso Português de Neurologia. Lisboa, 5 a 8 Novembro de 2001.

Introdução: Os acidentes vasculares cerebrais (AVC) afectam cerca de 10% das crianças com Anemia de Células Falciformes (ACF). A taxa de recorrência varia entre 46-90%, na ausência de terapêutica preventiva; quando esta é instituída reduz a recorrência a menos de 10%. A prevenção do primeiro infarto clínico, causa habitual de sequelas importantes, tem vindo a ser motivo de intensa investigação. O uso de doppler transcraniano (DTC) permite detectar alterações no fluxo arterial, associadas a risco de AVC subsequente (velocidade média >190 cm/seg ou <70 cm/seg numa grande artéria cerebral). A sua utilização periódica nos portadores de HbSS poderá contribuir para a prevenção tanto do primeiro AVC como da sua recorrência. Os infartos silenciosos cerebrais, postos em evidência pela RMN-CE, afectam cerca de 17% de doentes com ACF e poderão explicar as alterações cognitivas, reveladas por testes neuropsicológicos, em doentes assintomáticos. Estes testes podem ser um bom contributo para determinar a extensão e progressão da doença cerebrovascular clínica e subclínica na população com ACF.

Objectivos: Avaliar a repercussão neurológica, neuroimagiológica, neurovascular e neuropsicológica da ACF num grupo de crianças seguidas no HDE.

Material e Métodos: 25 crianças com ACF com idades compreendidas entre os sete e os 16 anos. Duas haviam sofrido AVC anterior sendo as restantes 23 assintomáticas. Todas elas foram submetidas a exame neurológico, RMN-CE, DTC e avaliação neuropsicológica.

Resultados: O exame neurológico revelou alterações apenas nos dois doentes com AVC prévio. Dos 23 doentes assintomáticos 10 apresentaram na RMN lesões compatíveis com infartos silenciosos. O DTC foi positivo em 4 casos, todos eles com lesões na RMN-CE. Os testes neuropsicológicos mostraram alterações em 14 crianças com ACF, sete delas com infartos silenciosos.

Discussão e Conclusões: Neste estudo 40% dos doentes apresentaram infartos silenciosos na RMN. O DTC foi normal na maioria dos doentes com infartos silenciosos, o que está em desacordo com a investigação mais recente. A avaliação neuropsicológica confirmou-se como contributo importante na detecção da doença neurovascular assintomática. A validade de cada um destes métodos e a associação mais vantajosa para a instituição duma terapêutica preventiva foram objecto de discussão.

4- ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES EM CRIANÇAS COM ANEMIA DAS CELULAS FALCIFORMES

L Braga ¹, G Nogueira ², M Ferreira ², S Kaku ², JM Videira Amaral ¹

¹ Unidade de Imuno-Hematologia do Hospital Dona Estefânia, Lisboa; ² Serviço de Cardiologia Pediátrica do Hospital de Santa Marta.

XXIV Congresso Português de Cardiologia. Funchal, Abril de 2003.

Introdução: A ACF poderá condicionar alterações cardiovasculares pela sobrecarga crónica de volume no coração ou pelos fenómenos vaso-oclusivos a nível pulmonar. Estas alterações encontram-se mal definidas em idades pediátricas.

Objectivos: Com o objectivo de identificar as alterações cardiovasculares mais prevalentes e correlaciona-las com o grau de anemia, terapêutica politransfusional e quelante fomos estudar 34 doentes homozigóticas HbSS, 16 do sexo feminino, com idade média de 155,84 meses (mínimo:6A; máximo:18A).

Material e Métodos: O diagnóstico de SS foi efectuado segundo parâmetros hematológicos e confirmação molecular. Todas as crianças foram submetidas a uma avaliação clínica, laboratorial, radiografia do tórax, electrocardiograma e ecocardiograma modo M, bidimensional e Doppler.

A hemoglobina média foi 8,2 g/dL (6,04/10,4), 5% tinham índice cardiorácico aumentado, tendo 14 crianças critérios de hipertrofia ventricular esquerda, e 2 critérios de hipertrofia ventricular direita no electrocardiograma. No ecocardiograma 28 crianças apresentavam ventrículo esquerdo (VE) dilatado, nove das quais submetidas a terapêutica politransfusional. Deste grupo quatro fizeram terapêutica quelante, não se verificando diferença significativa no grau de dilatação do VE relativamente aos que não fizeram este tratamento. Não se registou compromisso da função sistólica em nenhuma criança. Cinco crianças tinham insuficiência mitral ligeira. Na apreciação do coração direito identificaram-se três crianças com dilatação do ventrículo direito (VD), e duas com pressão no VD ligeiramente elevada, e numa o tempo médio de aceleração (0,07s) do fluxo na artéria pulmonar era sugestivo de

hipertensão pulmonar de grau ligeiro. Estes resultados foram influenciados pela pequena dimensão da amostra, pelo que requerem estudos mais alargados.

Conclusões: Nesta série a alteração mais freqüente foi a dilatação ventricular esquerda, sem compromisso da função sistólica. O grau de anemia está associado ao grau de dilatação do VE, enquanto a terapêutica quelante não parece interferir. A ausência de cor pulmonale crónico deve-se provavelmente à baixa faixa etária deste grupo de doentes.

5- COMPARISON OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING, NEUROPSYCHOLOGIC IMPAIRMENT AND TRANSCRANIAL DOPPLER ULTRASONOGRAPHY IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA

LB Braga¹, E Calado¹, J Ribeiro², L Caeiro¹, J Duarte³

¹ Departments of Pediatrics and Neurology, Central Pediatric Hospital Dona Estefânia, Lisbon, and ² Department of Medicine, Hospital S José Lisbon and ³Department of Resonance Magnetic Caselas, Lisbon, Portugal.

8th Annual Congress of the European Hematology Association. Lyon, Junho de 2003.

Background: Ischemic stroke is a frequent and potentially devastating complication of homozygous sickle cell anemia (Hb SS) and a major cause of long-term morbidity in children, affecting up to 11% of patients under age 20 years. The overt strokes are primarily the result of stenosis or occlusion involving the basal intracranial arteries, that eventually can be detected in a previous clinical stage by the use of transcranial Doppler (TCD) ultrasonography. Children with HbSS frequently have neuropsychological dysfunction, probably related with silent infarcts.

Aims: To compare the results of magnetic resonance imaging (MRI) of the brain, transcranial Doppler (TCD) screening of cerebral arteries and neuropsychologic effects in children and adolescents with sickle cell anemia to determine the correlation between these tests and their efficacy in clinical practice.

Methods: Children for this study were recruited from a population of patients with HbSS attending the Haematology outpatient clinic of a Central Pediatric Hospital in Lisbon. A total of 30 children with age ranged 7 to 16 years with HbSS were followed during three years and compared with a group of 30 sibling controls, with no history of neurologic disease. Three children of the sample had suffered overt stroke. We have used neurological examination as a marker of overt stroke, MRI as a marker of covert neurologic damage and TCD ultrasonography to identify asymptomatic children with Hb SS who were at high-risk for stroke, according to

Adams criteria. Neuropsychologic assement included tests of intelligence, attention ability, visual-spacial/constructional abilities, logical thought and perseveration.

Results: The 3 patients who had a previous overt stroke were the only that presented abnormal results in three tests. In the 27 asymptomatic children and adolescents, 10 (37%) showed ischemic infarcts on the MRI. mainly in subcortical frontal areas. The neuropsychological study showed abnormalities in 25 (92,5%) patients, detected at least in one of the five tests. The TCD was abnormal in 4 patients (14,8%). In three cases the positive criteria was the ratio ACA/MCA $\geq 1,2$ and one patient had MCA mean velocity $> 190\text{cm/sec}$. Only one of the asymptomatic patients had all the different three tests positive.

Conclusions: This results in a small group of children with HbSS showed that the neurologic assement seems to be a good marker for cognitive impairment in patients who are at risk of silent infarcts. We commented that TCD and MRI examinations are not correlated and probably reveal different aspects of the pathophysiology of central nervous system in HbSS. The validity of each method in children are matter under discussion, because the need for early prophylactic therapeutic before cerebral infarction occurs.

•

6- RISK FACTORS FOR VASO-OCCLUSIVE CRISIS IN CHILDREN WITH SICKLE CELL ANEMIA

L Braga¹, I Correia³, A Miranda³, I Picanço³, MT Seixas³, I Ferreira², T Santos², HA Santos², T Rosário², F Nogueira², I Griffe², A Viveiros², P Nogueira⁴

¹ Department of Imuno-Haematology, ² Department of Clinical Pathology – Central Paediatric Hospital of Dona Estefânia – Lisbon, ³ Laboratory of Haematology and ⁴O.N.S.A/National Health Institute Dr Ricardo Jorge- Lisbon. Portugal

8th Annual Congress of the European Hematology Association. Lyon, Junho de 2003.

Background: In sickle cell disease (SCD), painful vaso-occlusive episodes (VOE) are responsible for the multiorgan failure syndrome and insofar prognostic of the morbidity and mortality rates. Although due to a single point mutation in the beta-globin encoding gene, the clinical expression of the sickle cell disease varies and thus knowledge of the phenotypic variability and its underlying factors is of major importance for the understanding of SCD pathophysiology. Fibrinogen increases the adherence of sickle erythrocytes to the endothelium in the beginning of the vaso-occlusion. High fibrinogen and lipid levels independent risk factors for stroke, coronary heart disease and peripheral artery disease. Although several polymorphisms have been described in the genes encoding for fibrinogen chains,

available evidence on their association with plasmatic blood levels remains controversial.

Aims: An evaluation is made of several risk factors, which might influence the phenotypic expression of SCD, namely: plasmatic fibrinogen levels, fibrinogen polymorphism, haematological parameters and biochemical data.

Methods: The patients were the 34 children with SCD (age range: 7-18 years; 16 female, 18 male; predominantly of African origin) attending the Haematology outpatient clinic of a Central Paediatric Hospital in Lisbon. Three of the children were on regular transfusion regime, due to previous strokes. During the three-year study, conducted during the disease's stable phase, children were classified into two groups, based on the number of previous VOE (less than 3 VOE per year; 3 or more VOE per year). SCD diagnosis was made through haematological parameters and molecular techniques.

Symptoms associated with SCD were assessed to form a severity index (SI) using El-Hazmi (1992) criteria. Laboratory analysis focused on four fibrinogen polymorphisms (Hind III, Bcl I, Ava II, Mnl I), plasmatic fibrinogen levels, HbF values and haematological parameters.

Results: There is a positive linear correlation between the SI and the number of VOE per patient in both genders. In the female gender, the number of children with 2 or more VOE predominates.

No statistically significant differences were found between the two groups of patients with regard to the four fibrinogen polymorphisms studied (including the 3 stroke cases).

Haematological and biochemical average values between the two groups were compared using Student's t-test. Statistically significant differences were detected for direct bilirubin ($P=0,039$), AST ($P=0,014$) and ALT ($P=0,011$). Reticulocyte ($P=0,060$), leukocyte ($P=0,062$), ALP ($P=0,062$) and γ GT ($P=0,087$) differences are borderline statistically significant. These results are influenced by the small sample size, and an enlarged study is required.

Conclusions: The studied sample of children with SCD, from various geographical origins, predominantly present moderate sickle cell anemia. The identification of laboratory and biochemical risk factors based uniquely upon isolated markers yields imprecise results. Early diagnosis of the SCD allows the establishment of timely therapeutics, but further knowledge of factors is needed to balance treatment risks against disease severity risks.

•

7- CLINICAL AND LABORATORY EFFECTS OF HYDROXYUREA IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA: A PORTUGUESE HOSPITAL STUDY

LB Braga¹, AC Ferreira¹, M Guimarães², Nazário C,² Pacheco P,³ Miranda A,⁴ Picanço I,⁴ Seixas T⁴, L Rosado¹, JM Videira Amaral⁵

¹ Pediatric Immune-Hematology Unit, Dona Estefânia's Pediatric Hospital, Lisbon, Portugal; ² Hematology Laboratory, Dona Estefânia's Pediatric Hospital, Lisbon, Portugal; ³ Molecular Biology Laboratory, Center Genetic Humane, Dr. Ricardo Jorge's Health National Institute, Lisbon, Portugal; ⁴ Hematology Laboratory Center Biophatology, Dr. Ricardo Jorge's Health National Institute, Lisbon, Portugal; ⁵ Pediatric Department, Dona Estefânia's Pediatric Hospital, Lisbon, Portugal

Purpose: To assess the efficacy and safety of hydroxyurea (HU) in children with severe forms of sickle cell anemia followed in a Portuguese hospital.

Patients/Methods: We carried out an open-label, uncontrolled prospective study which included children older than 8 years of age with severe forms of sickle cell disease. Hydroxyurea was started at of 15 mg/kg per day and the dose was escalated to a maximum tolerated dose or a dose of 25 mg/kg per day. Blood count, renal and liver functions, and haemoglobin F levels were monitored regularly. Clinical response was assessed by record of number of vaso-occlusive crises, requirement for hospital admission and blood transfusions.

Results : Nine children and adolescents, five girls and four boys, with median age of 13 years (range 8 to 16) were enrolled in the study, during a of 25 months. All patients completed at least 15 months of therapy. The mean maximum dose of hydroxyurea was 19 ± 4 mg/kg. The mean initial Hb F level significantly increased, from a mean of $7.0 \pm 3.9\%$ to $13.7 \pm 5.3\%$ (p 0.028). Clinically, all the patients responded significantly with a reduction of 80% in the number of vaso-occlusive crises (VOC), 69% in hospital admissions, 76% in hospitalization days and 67% in transfusion requirements. Globally, there wasn't significant mielo, renal and hepatic toxicity after 15 monts of HU therapy.

Conclusions : We concluded that, in our population, HU proved to be effective in increasing Hb F levels, and in decreasing hospitalizations for VOC and transfusion requirements with no major side effects. Long-term clinical follow-up is important to certify benefit maintenance.

Keywords: Sickle cell anemia, Hydroxyurea (HU), Children. In press.

RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO

- A base de dados referente a cada indivíduo que faz parte do material deste estudo (quadros discriminativos individuais) poderá ser consultada no secretariado do Centro Universitário da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa no Hospital de Dona Estefânia.
- Rua Dona Estefânia 1169-025 Lisboa.
- Telefone: 213126914/21353050
- Fax: 213545007
- mail: pediatria@fcm.unl.pt